



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) Oversættelse af
europæisk patentskrift

(51) Int.CP.: C 11 B 3/00 A 21 D 8/04 A 23 K 1/165 C 12 N 1/15 C 12 N 1/21
C 12 N 9/20 C 12 N 15/55 C 12 N 15/80 C 13 D 3/00 C 13 K 1/08
// (C 12 R 1:66 C 12 R 1:77) C 12 R 1:19

(45) Oversættelsen bekendtgjort den: 2003-01-27

(80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds
bekendtgørelse om meddelelse af patentet: 2002-10-30

(86) Europæisk ansøgning nr.: 97610056.0

(86) Europæisk indleveringsdag: 1997-12-09

(87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: 1998-10-07

(30) Prioritet: 1996-12-09 DK 140896 1996-12-16 DK 143296 1997-02-21 DK 19097
1997-02-26 DK 21197 1997-11-11 DK 128397

(84) Designerede stater: AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

(73) Patenthaver: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark

(72) Opfinder: Clausen, Ib Groth, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Patkar, Shamkant Anant, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Borch, Kim, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Halkier, Torben, Hestkøbvej 11E, 3460 Birkerød, Danmark
Barfoed, Martin, 4708 Royal Troon Drive, Raleigh, NC 27604, USA
Clausen, Kim, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Fuglsang, Claus Crone, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Dybdal, Lone, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark

(74) Fuldmægtig i Danmark: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark

(54) Benævnelse: Reduktion af phosphor-indeholdende bestanddele i spiseolier; som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase, en phospholipase fra en trådsvamp, der har en phospholipase A og/eller B aktivitet

(56) Fremdragne publikationer:

EP-A- 0 130 064

EP-A- 0 622 446

EP-A- 0 654 527

WO-A-97/05219

WO-A-98/18912

JP-A- 7 231 788

US-A- 5 264 367

BUCHOLD H: "ENZYMATISCHE PHOSPHATIDENTFERNUNG AUS PFLANZENOELEN" FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE- FAT SCIENCE TECHNOLOGY, vol. 95, no. 8, 1 August 1993 (1993-08-01), pages 300-304, XP000385706
DATABASE WPI Section Ch, Week 9030 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 90-226962
XP002107471 -& JP 02 153997 A (SHOWA SANGYO CO), 13 June 1990 (1990-06-13)
DATABASE WPI Section Ch, Week 9013 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 90-096521

BEST AVAILABLE COPY

fortsættes

XP002107472 -& JP 02 049593 A (SHOWA SANGYO CO), 19 February 1990 (1990-02-19)

NAGAO TOSHIHIRO ET AL: "Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 116, no. 3, 1994, pages 536-540, XP002157254 ISSN: 0021-924X

MASUDA N ET AL: "PRIMARY STRUCTURE OF PROTEIN MOIETY OF *PENICILLIUM-NOTATUM* PHOSPHOLIPASE B DEDUCED FROM THE CDNA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 202, no. 3, 1991, pages 783-788, XP000971864 ISSN: 0014-2956

Opfindelsens område

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til reduktion af indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase.

Den foreliggende opfindelse angår yderligere et enzym med phospholipase-aktivitet, en klonet DNA-sekvens, der koder for enzymet med phospholipase-aktivitet, en fremgangsmåde til frembringelse af enzymet og anvendelse af nævnte enzym til en række industrielle formål.

Opfindelsens baggrund

15 Enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en relativ stor mængde ikke-hydrerbart phosphorindhold

Anvendelsen af phospholipase til enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm) til at reducere phosphorindholdet i nævnte vanddegummeret spiseolie er velkendt.

20 Denne proces kan imidlertid forbedres yderligere, især til udførelse af enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor (NHP) og/eller relativt store mængder af mucilago.

25 Følgeligt er et formål for opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i sådanne olie, hvor nævnte fremgangsmåde omfatter anvendelse af en phospholipase.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen

Phospholipider, såsom lecithin eller phosphatidylcholin, består af glycerol, der er esterificeret med to fedtsyrer i den ydre (sn-1) og den midterste (sn-2) position og esterificeret med phosphorsyre i den tredje position; phosphorsyren igen kan være esterificeret til en aminoalkohol. Phospholipaser er enzymer, der tager del i hydrolysen af phospholipider. Adskillige typer af phospholipase-aktivitet kan skelnes fra hinanden, herunder phospholipaseme

A₁ (PLA₁) og A₂ (PLA₂), som hydrolyserer én fedtsyregruppe (i henholdsvis sn-1- og sn-2-positionen) til frembringelse af lysophospholipid, og lysophospholipase (eller phospholipase B (PLB)), som kan hydrolyser den resterende fedtsyregruppe i lysophospholipid.

5

Denne opfindelse angår blandt andet en phospholipase fra en trådsvamp, som har evnen til at hydrolyser den ene og/eller begge fedtsyregupper i et phospholipid (det vil sige fremviser PLA- og/eller PLB-aktivitet).

10

Tidligere karakteriserede PLA- og/eller PLB-enzymer fra svampe

Talrige referencer beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser. For at gøre det lettere at få et overblik over status inden for området, er referencerne blevet grupperet i to afsnit.

15

Afsnit ét vedrører referencer, som beskriver identificeringen af svampe-phospholipaser, som man aktuelt ikke mener er beslægtede med svampe-phospholipasen ifølge den foreliggende opfindelse. Disse referencer er hovedsageligt indbefattet for at sammenfatte status inden for området karakterisering af svampe-phospholipaser.

20

Afsnit to vedrører referencer, som beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser, som menes at være relevante for svampe-phospholipaserne ifølge den foreliggende opfindelse.

25

Afsnit ét

30

Enzymer med phospholipase A- og/eller B-aktivitet er blevet fundet i forskellige svampekilder, herunder *Penicillium notatum* (der også er kendt som *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem. 77:1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5):393-401, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem. 49(4):1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem. 269:19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (gammelt navn *Saccharomyces rosei*; Y. Kuwabara, Agric. Biol. Chem. 52(10):2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters 124:29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60(7):1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-

zyme™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; *Process Biochemistry* 30(5):393-401 (1995)) og *Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., *Agric. Biol. Chem.* 43(3):517-525, 1979).

5 Afsnit to

EP 575133 A2 beskriver isoleringen og karakteriseringen af en svampe-phospholipase A1, som er opnået fra *Aspergillus*, og anvendelsen deraf til industrielle formål.

10 Der er ingen sekvensinformation (hverken DNA- eller aminosyre-) indbefattet i ansøgningen, ej heller er nogen strategi eller noget forslag til kloning af noget af *Aspergillus*-phospholipasen beskrevet eller anført i ansøgningen.

15 Tsung-Che et al. (*Phytopathological notes* 58:1437-38 (1968)) beskriver kort karakteriseringen af en phospholipase fra *Fusarium solani*.

EP 130 064 beskriver en isoleret fraktion af et fermenteringsmedium, der fremviser lipase-aktivitet, som er opnået fra stammen *Fusarium oxysporum* 20 DSM 2672. Ydermere er anvendelsen deraf i detergentsammensætninger beskrevet. EP 130 064 beskriver imidlertid ikke denne fraktion som fremvisende phospholipase-aktivitet.

25 WO 96/13579 beskriver en lipase, som er opnået fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94, herunder dens N-terminale sekvens.

WO 96/13579 beskriver imidlertid ikke noget enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

30 En cDNA-sekvens, som koder for en lipase fra *Fusarium heterosporum* er beskrevet (Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*, *J. Biochem.* 116:536-540, 1994). Denne sekvens menes aktuelt at være den DNA-sekvens, der er mest beslægtet med en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidlige kendt materiale" (se nedenfor)). Denne reference beskriver imidlertid ikke noget enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet.

En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne klonede DNA-sekvens har imidlertid meget begrænset homologi med en DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)).

5

Industriel anvendelse af phospholipaser

En række anvendelser af phospholipaser er kendte, såsom anvendelse af phospholipase i for eksempel enzymatisk degummering af en vanddegummeret olie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm), behandling af stivelseshydrolysat (især fra hvedestivelse) til forbedring af filtrerbarheden (EP 219 269, CPC International), som tilsætningsstof til brøddej til at forbedre brødets elasticitet (US 4 567 046, Kyowa Hakko), og til fremstilling af lysolecithin med specielle emulgerende egenskaber.

10

Aktuelt anvendes phospholipasen Lecitase® (Novo Nordisk A/S) kommersielt til for eksempel degummering af olier. Lecitase® er et mammalia-enzym, som er opnået fra svinepancreas.

15

Det er velkendt, at det er muligt at danne svampeenzyme rekombinant med opnåelse af industrielt økonomisk acceptable udbytter, især fra trådsvampe.

20

Følgeligt er det et formål for denne opfindelse at tilvejebringe en forbedret phospholipase til anvendelse for eksempel i processerne, der er beskrevet ovenfor.

25

Det er endvidere et formål for den foreliggende opfindelse at beskrive processer og fremgangsmåder til rekombinant produktion med industrielt acceptable udbytter af en phospholipase, som er opnået fra en trådsvamp.

30

Sammendrag af opfindelsen

35

Vanddegummering af spiseolier udføres ved hjælp af ekstraktion med vand. Ved denne behandling efterlades en del af phosphatiderne i olien. Denne del beskrives ved hjælp af fællesbetegnelsen "ikke-hydrerbare phosphatider" (NHP). Ved produktionen af olier er det essentielt at fjerne NHP-indholdet (US

5 264 367).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i en olie, som omfatter en relativ stor mængde af NHP.

5

Følgeligt angår opfindelsen i et første aspekt en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som har et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, der er målt ved hjælp af:

10

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

15

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

20

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer, og

25

vi) herefter udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien,

og hvor nævnte fremgangsmåde omfatter:

30

kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5-8 og en vandig opløsning af en phospholipase A1, en phospholipase A2 eller en phospholipase B, idet opløsningen emulges i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

35

I et andet aspekt angår opfindelsen en ny klonet phospholipase.

- Yderligere undersøgelser af karakteren af lipase-aktiviteten, som findes i *Fusarium oxysporum* DSM 2672 (og er beskrevet i EP 130 064), viste, at den isolerede fraktion omfatter adskillige bestanddele med lipase-aktivitet, hvoraf den ene fremviste phospholipase-aktivitet.
- 5
- På trods af en række tekniske vanskeligheder (se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klone et enzym, som fremviser phospholipase A-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, mere specifikt *Fusarium oxysporum*.
- 10
- Dette er første gang en phospholipase A fra en trådsvamp er blevet klonet, og følgeligt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en klonet DNA-sekvens, som koder for et phospholipase A-enzym fra en trådsvamp.
- 15
- Følgeligt angår ét aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, som koder for et polypeptid med phospholipase A-aktivitet, hvor DNA-sekvensen er opnået fra en trådsvamp.
- 20
- En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet i Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991.
- 25
- Denne DNA-sekvens fremviser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og endvidere varierer en fysiologisk egenskab, såsom molekylemassen, betydeligt mellem nævnte PLB fra *P. notatum* (66 kDa) og en phospholipase ifølge opfindelsen (29 ± 10 kDa (se nedenfor)).
- 30
- Endvidere har en sammenligning med kendte nukleotid- og aminosyresekvenser vist, at DNA-sekvensen og/eller den tilsvarende kodede aminosyresekvens ifølge opfindelsen kun har ringe homologi med alle kendte DNA- og/eller aminosyresekvenser (se nedenfor).
- 35
- Følgelig mener man aktuelt, at DNA-sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning, vil være meget værdifuld til for eksempel kloning af en anden beslægtet/homolog phospholipase-kodende DNA-sekvens, da en specifik hybridiseringsprobe og/eller PCR-primere nu let kan konstrueres på

basis af nævnte DNA-sekvensens ifølge opfindelsen.

Yderligere mener man aktuelt, at det er muligt at klone både en
5 beslægtet/homolog phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-
sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den
foreliggende ansøgning.

Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt en klonet DNA-sekvens, som
10 koder for et enzym, der fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-
aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

- (a) den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet
ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 15 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,
mere fortinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere
fortinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1, eller den komplementære
streg dertil,
- 20 (c) en DNA-sekvens, der er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-
sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),
- (d) en DNA-sekvens, der er defineret i (a) eller (b), som koder for et
25 polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog
med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
eller mere fortinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er
vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- 30 (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-
probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ
ID NO: 1, ved lav stringens,
- 35 (f) en DNA-sekvens, som koder for et polypeptid, der har de samme
aminosyresekvenser i positionerne 1 til 346, 31 til 303 eller 31 til 303 i SEQ
ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken
som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

- (g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specifiseret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).
- 5 Endvidere er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet grundigt karakteriseret, og det har vist sig, at den har phospholipase-aktivitet ved lavt pH, denne egenskab gør den meget egnet til anvendelse til oliedegummering. Phospholipasen er ikke membranbundet, hvilket gør den egnet til kommerciel produktion og oprensning.
- 10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:
- 15 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
- ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
- iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
- 20 iv) et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
- v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C.
- 25 En udledt aminosyresekvens for en isoleret phospholipase ifølge opfindelsen er vist i SEQ ID NO: 2.
- 30 Den N-terminale aminosyresekvens for en moden secereret isoleret phospholipase er blevet bestemt. Nævnte N-terminale sekvens viste, at den modne del af en phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, starter i aminosyre nr. 31 i SEQ ID NO: 2. Se forsøgseksempel hen for yderligere detaljer (se nedenfor).
- 35 Endvidere er den C-terminale sekvens for en aktiv secereret phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, blevet bestemt. Nævnte C-terminal-bestemte phospholipase blev rekombinant

udtrykt i trådsvampestammen *Aspergillus oryzae*. Se forsøgseksempel heri for yderligere henvisning.

- 5 Disse resultater viste, at enzymet blev C-terminalt processeret under ekspression fra *A. oryzae*, og resultaterne tyder på, at Ser303 i SEQ ID NO: 2 er den mest sandsynlige C-terminale rest i det udtrykte modne aktive enzym. Det forudsæs imidlertid, at endnu yderligere C-terminal processering kan finde sted (det vil sige, som frembringer et fragment af nævnte sekvenser), og at man stadig har et udtrykt modent aktivt enzym.
- 10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller B-aktivitet og er valgt fra gruppe, der omfatter:
- 15 (a) et polypeptid, som kodes af den phospholipase A- og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 20 (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
- (c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- 25 (d) en analog til polypeptider, der er defineret i (a), (b) eller (c), idet analogen er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og
- (e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).
- 30 I endnu et yderligere aspekt tilvejebringer opfindelsen en rekombinant ekspressionsvektor, som åbner mulighed for heterolog rekombinant produktion af et enzym ifølge opfindelsen. Det er derved muligt at lave en stærkt oprenet phospholipase-sammensætning, som er kendtegnet ved at være fri for homologe urenheder. Det er yderst fordelagtigt til en række industrielle
- 35 anvendelser.

Den foreliggende opfindelse viser eksperimentelt (se nedenfor), at en

5 phospholipase, der er opnået fra en stamme af *Fusarium culmorum* og *Fusarium oxysporum*, har forbedrede egenskaber til anvendelse til industrielle relevante formål. Det forudsese, at phospholipaser, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, vil have forbedrede egenskaber, der er relevante til anvendelse til anvendelse til industrielle formål.

10 Følgeligt angår opfindelsen i endnu et yderligere aspekt anvendelsen af en phospholipase, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *Fusarium oxysporum*, i en proces, der omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtsyregrupperne.

15 Endelig angår opfindelsen en isoleret, i det væsentlige ren biologisk kultur af *Escherichia coli*-stammen DSM 11299, som indeholder en phospholipase-kodende DNA-sekvens (den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299), der er opnået fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, eller en hvilket som helst mutant af nævnte *E. coli*-stamme, som har bevaret 20 den phospholipase-kodende egenskab.

Homologisammenligning med kendte sekvenser

25 Der blev udført en homologisøgning med phospholipasen ifølge opfindelsen mod nukleotid- og proteindatabaser. Homologisøgningen viste, at den tættest beslægtede kendte sekvens var en lipase fra *Fusarium heterosporum* (en parallelopstilling af aminosyrer er vist i figur 1).

30 DNA-sekvensen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 1, 23-1060), som koder for phospholipasen, viser kun 62 % DNA-homologi med den kendte lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum* (Genbank-databaserefrence S77816), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 60 % homologi med en udledt aminosyresekvens på basis af den kendte DNA-sekvens ovenfor (se figur 1).

35 Dette viser, at DNA- og/eller aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen rent faktisk er forskellig fra alle kendte DNA- og/eller

aminosyresekvenser.

5 En cDNA-sekvens, der koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum* er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne DNA-sekvens (Genbank-databaserefrence X60348) viser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 20 % lighed med en udledt aminosyresekvens, der er baseret på den kendte PLB-DNA-sekvens 10 ovenfor.

Beregningerne af homologi blev udført som beskrevet senere i denne specifikation.

15 Tegninger

Figur 1: Parallelstilling af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2 med en kendt lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum*.

20 Figur 2: Sammenligning af enzymatisk degummeringsevne hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen.

Definitioner

25 Før en mere detaljeret gennemgang af denne opfindelse vil følgende udtryk blive defineret.

30 "En klonet DNA-sekvens": Udtrykket "en klonet DNA-sekvens" henviser til en DNA-sekvens, der er klonet ifølge standard-kloningsprocedurer, som anvendes ved gensplejsning til at flytte et segment af DNA fra dens naturlige placering til et andet site, hvor det vil blive reproduceret. Kloningsprocessen inddrager udskæring og isolering af det ønskede DNA-segment, insertion af DNA-stykket i vektormolekylet og inkorporering af den rekombinante vektor i en celle, hvor talrige kopier eller kloner af DNA-segmentet vil blive replikeret.

35 Den "klonede DNA-sekvens" ifølge opfindelsen kan alternativt benævnes "en DNA-konstruktion", "et klonet polynukleotid med en DNA-sekvens" eller "en

isoleret DNA-sekvens".

5 **"Opnået fra"**: Til formålet i den foreliggende opfindelse betyder udtrykket "opnået fra" som anvendt heri i forbindelse med en specifik mikrobiel kilde, at enzymet og følgeligt DNA-sekvensen, der koder for nævnte enzym, er dannet af den specifikke kilde eller af en celle, hvori et gen fra kilden er blevet indsat.

10 **"Et isoleret polypeptid"**: Som defineret heri henviser udtrykket "et isoleret polypeptid" eller "en isoleret phospholipase" som anvendt om phospholipasen ifølge opfindelsen til en phospholipase eller phospholipasedel, som i det væsentlige er fri for andre ikke-phospholipase-polypeptider, for eksempel mindst 20 % ren, fortinvis mindst 40 % ren, mere fortinvis 60 % ren, endnu mere fortinvis 80 % ren, mest fortinvis 90 % ren og endnu mest fortinvis 95 % ren, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE.

15 Når det isolerede polypeptid er mindst 60 % rent kan udtrykket "et stærkt isoleret polypeptid" anvendes. Det "isolerede polypeptid" kan alternativt benævnes "oprenset polypeptid".

20 **"Homologe urenheder"**: Som anvendt heri betyder udtrykket "homologe urenheder" en hvilken som helst urenhed (for eksempel et andet polypeptid end enzymet ifølge opfindelsen), som stammer fra den homologe celle, hvorfra enzymet ifølge opfindelsen oprindeligt er opnået. I den foreliggende opfindelse kan den homologe celle for eksempel være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

25 **"Phospholipase-kodende del"**: Som anvendt heri betyder udtrykket "phospholipase-kodende del", når det anvendes i forbindelse med en DNA-sekvens, det område af DNA-sekvensen, som svarer til det område, der er translateret til en polypeptidsekvens.

30 I DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, er det området mellem den første "ATG"-startkoden ("AUG"-kodon i mRNA) og den følgende stopkodon ("TAA", "TAG" eller "TGA").

35 Det translaterede polypeptid kan yderligere foruden den modne sekvens, som fremviser phospholipase-aktivitet, omfatte et N-terminalt signal og/eller en

propeptidsekvens. Signalsekvensen styrer almindeligvis sekretionen af polypeptidet, og propeptidet styrer almindeligvis foldningen af polypeptidet. For yderligere information se Egnell, P., et al., Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992) eller Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company/New York, 5 ISBN 0-7167-1920-7.

"Modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens": Udtrykket "modifikation(er)", der anvendes i forbindelse med modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens som beskrevet heri, defineres til at indbefatte 10 kemisk modificering såvel som genmanipulation(er). Modificeringen eller modificeringerne kan være substitution, deletion og/eller insertion i aminosyren eller aminosyrene af interesse.

"Phospholipase A": Udtrykket "phospholipase A", som anvendes heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen, påtænkes at dække et enzym 15 med phospholipase A1- og/eller phospholipase A2-aktivitet.

Phospholipase A1 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.32.
20 Officielt navn: phospholipase A1 (PLA1).
Katalyseret reaktion:
phosphatidylcholin + h(2)o <>
2-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.
Kommentar(er): har en meget bredere specifitet end EC 3.1.1.4.

25 Phospholipase A2 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.4.
Officielt navn: phospholipase A2 (PLA2).
Alternativt navn(e): phosphatidylcholin 2-acylhydrolase, lecithinase a, 30 phosphatidase eller phosphatidolipase.
Katalyseret reaktion:
phosphatidylcholin + h(2)o <>
1-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.
Kommentar(er): virker også på phosphatidylethanolamin, cholinplasmalogen 35 og phosphatider, idet den fjerner fedtsyren, der er bundet til 2-positionen.

"Phospholipase B": defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC

3.1.1.5.

Officielt navn: lysophospholipase.

Alternativt navn(e): lecithinase b, lysolecithinase, phospholipase b eller plb.

Katalyseret reaktion:

5 2-lysophatidylcholin + h(2)o <> glycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

10 "Phospholipase-aktivitet": Udtrykket "phospholipase-aktivitet" eller "har/fremviser phospholipase-aktivitet" påtænkes som anvendt heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen at specificere et enzym, som mindst har den mængde phospholipase-aktivitet (hvor enten det er PLA eller PLB), der defineres eksperimentelt nedenfor.

15 Følgeligt defineres et enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet, heri som et enzym, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6 heri (se nedenfor), har en phospholipase-aktivitet på mindst 0,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/min., 20 enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C.

25 Man mere på nuværende tidspunkt, at kun et enzym med en sådan signifikant phospholipase-aktivitet har industriel interesse, for eksempel til anvendelse til degummering (US 5 264 367).

30 "En lipase med phospholipase-sideaktivitet": Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med en phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal.

35 En række lipaser har en sådan phospholipase-sideaktivitet. I forsøgseksempel 6 heri (se nedenfor) er vist nogle af lipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

"En råolie": En råolie (kaldes også en ikke-degummeret olie) kan være en presset eller ekstraheret olie eller en blanding deraf fra for eksempel rapsfrø,

sojabønne eller solsikke. Phosphatid-indholdet i en råolie kan variere fra 0,5-3 % (vægt/vægt) svarende til et phosphorindhold i intervallet 200-1200 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 250-1200 ppm. Bortset fra phosphatidene indeholder råolien også små koncentrationer af carbohydrater, sukkerforbindelser og metal/phosphatidsyre-komplekser med Ca, Mg og Fe.

5 "En semiråolie": En hvilken som helst olie, som ikke er en råolie, men som har et phosphatid-indhold på over 250 ppm, mere fortrinsvis på over 500 ppm. En sådan olie kunne for eksempel opnås ved at udsætte en råolie for en proces 10 tilsvarende "vanddegummeret olie"-processen, der er beskrevet nedenfor.

15 "En vanddegummeret olie": En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande 1-3 % (vægt/vægt) varm vand med varm (60-90 °C) råolie. Sædvanlige behandlingstider er 30-60 minutter. Vanddegummingstrinet fjerner phosphatidene og slimagtige gummier, som bliver uoplöselige i olien, når de hydreres. De hydrerede phosphatider og gummier kan separeres fra olien ved hjælp af fældning, filtrering eller centrifugering - idet centrifugering er den mest almindelige metode.

20 Det essentielle formål med nævnte vanddegummeringsproces er at separere de hydrerede phosphatider fra olien. Blandingen af varmt vand i olien, der er beskrevet ovenfor, skal heri forstås bredt som blanding af en vandig opløsning i olien ifølge kendte standard-vanddegummeringsprocedurer.

25 Alternativt kan processen, som her benævnes "vanddegumming af olie", kaldes "vådraffinering til fjernelse af mucilago" (se US 5 264 367).

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

30 En fremgangsmåde til enzymatisk degumming af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbare phosphatider/phospholipider

Til den foreliggende opfindelse måles mængden af ikke-hydrerbart phosphor i en spiseolie ved hjælp af:

35 i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie =

4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

- 5 ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,
- 10 iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,
- iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,
- 15 v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand (til bundfældning) i 24 timer, og
- vi) efter bundfældning udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien.

For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

- 20 Som illustreret i forsøgseksemplerne heri varierer phospholipidsammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) betydeligt i forskellige spiseolier. Følgeligt vil niveauet af resterende phospholipid i forskellige vanddegummerede olier varierer over et bredt interval (for eksempel fra ca. 30 ppm til 200 ppm).
- 25 Til enzymatisk degumming afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede efter vanddegumming eller citronsyre/vand-forbehandling som defineret ovenfor.
- 30 Endvidere gælder det, at jo højere mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede i olien, er, jo mere effektiv er den enzymatiske degummeringsmetode.
- 35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i olie, som omfatter en relativ høj mængde af NHP.
- Fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 60 ppm, mere fortrinsvis mindst 100 ppm og endnu mere fortrinsvis mindst 200

ppm.

- 5 Mere fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold i intervallet 60-500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 100-500 ppm og endnu mere fortrinsvis i intervallet 200-500 ppm.
- 10 En spiseolie, der ifølge beskrivelsen heri er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor kan være en vanddegummeret olie eller mere fortrinsvis en råolie eller en semiråolie.
- 15 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelse, hvor nævnte spiseolie er en råolie, som er kendtegnet ved at nævnte råspiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er en olie med et phosphorindhold på over 250 ppm (part per million), idet olien ikke er blevet vanddegummeret (vanddegummering omfatter blanding af varmt vand i en varm råolie, efterfulgt af fjernelse af phosphatider, som bliver uopløselige i olien, når den hydreres) før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.
- 20 En sådan råspiseolie har fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold på over 350 ppm, mere fortrinsvis over 400 ppm, endnu mere fortrinsvis over 500 ppm, og mest fortrinsvis over 600 ppm.
- 25 Nævnte råspiseolie har endvidere fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold i intervallet 250-1500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 350-1500 ppm, endnu mere fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm og mest fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm.
- 30 Den enzymatiske degummeringsmetode af en råspiseolie ifølge opfindelsen er fordelagtig i forhold til kendte metoder til enzymatisk degumming af vanddegummerede spiseolier (US 5 264 367), da en direkte enzymatisk degummeringsmetode til behandling af en råolie ifølge opfindelse vil spare det første trin med vanddegumming af olien.
- 35 Dette sparer både tid og penge. En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande varmt vand i varm (60-90 °C) råolie i sædvanligvis 30-60 minutter. I

modsætning hertil kan den fulde proces til enzymtisk degummering af råolier ifølge opfindelsen udføres på mindre end 1 time med faktisk enzymatisk behandling i ca. 25 minutter. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

- 5 Endvidere kan en spiseolie, der er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor ifølge beskrivelsen heri, være en semiråolie.

- 10 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelsen, hvor nævnte spiseolie er en semirå spiseolie, som er kendetegnet ved at nævnte semirå spiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har et phosphorindhold på over 500 ppm, og hvor nævnte olie er blevet vanddegummeret før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

- 15 Nævnte halvrå spiseolie er fortrinsvis en olie, som før udførelse af nævnte fremgangsmåde har et phosphorindhold på over 600 ppm, mere fortrinsvis over 750 ppm.

- 20 Almindeligvis vil vanddegummering af en spiseolie reducere phosphorindholdet i olien til et niveau på under 500 ppm.

- 25 Følgeligt er en semiråolie som beskrevet heri for eksempel måske kun blevet delvist vanddegummeret før udførelse af en fremgangsmåde til reduktion af niveauet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen.

- 30 Udtrykket "delvist vanddegummeret" angiver, at vanddegummeringsproceduren af olien kun har været en delvis/kort proces sammenlignet med en standard-vanddegummeringsprocedure.

- 35 En "delvis vanddegummerings"-proces kan udføres ved kun at blande 0,5 % varmt vand i olien (standard er 1-3 % varmt vand. Se afsnittet "Definitioner" heri) eller ved at reducere behandlingstiden til 10 minutter (standard er 30-60 minutter).

- 35 Alternativt kan en semiråolie som defineret heri være en blanding af en råolie og en semiråolie.

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde ifølge en hvilken som helst del af det første aspekt af opfindelsen, som omfatter følgende trin:

- 5 i) justering af temperaturen i spiseolien til en temperatur mellem 25 °C og 70 °C,
- 10 ii) forbehandling af spiseolien til ovennævnte justerede temperatur ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand, i 5-120 minutter, hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien,
- 15 iii) justering af pH i vand/olie-emulsionen til en pH mellem 1,5 og 8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning),
- 20 iv) kontaktbringning mellem vand/olie-emulsionen og en vandig opløsning af en phospholipase (ved en temperatur (± 5 °C), der er justeret ifølge trin i)), idet phospholipasen er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm,
- 25 v) separering af vandfasen fra den behandlede olie.

Temperaturen i spiseolien i trin i) umiddelbart ovenfor justeres fortrinsvis til en temperatur, som er den optimale temperatur for phospholipase-aktivitet for enzymet, der anvendes i fremgangsmåden.

For den kommersielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) er denne ca. 60 °C, og for en phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra trådsvampestængten *Fusarium*, er den ca. 45 °C. Se forsøgseksempler heri for yderligere detaljer angående dette emne.

- Det forudsese, at hovedparten af trådsvampe-phospholipasene vil have et temperaturopimum omkring 35-50 °C.
- 35 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen fremgangsmåden, der er beskrevet umiddelbart ovenfor, hvor temperaturen i spiseolien i trin i) justeres til en temperatur mellem 35 °C og 50 °C, og phospholipasen, der anvendes i

trin iv) er opnået fra en trådsvampestamme.

I trin ii) i fremgangsmåden ovenfor forbehandles spiseolien ved den justerede temperatur (trin i)) ved hjælp af tilslætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand i 5-120 minutter, og hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien.

Dette trin er et standard-forbehandlingstrin ved enzymatisk degummering af spiseolier (US 5 264 367, US 5 558 781). Formålet med trin ii) er at hydrere de hydrerbare/hydrofile bestanddele (såsom det hydrerbare phosphorindhold) i spiseolien, som, når de hydreres, bliver uopløselige i olien.

Dette trin er imidlertid anderledes end, hvad man benævner "vanddegummering af en spiseolie" i den foreliggende forbindelse. Én vigtig forskel er, at nævnte forbehandlingstrin ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien. Fjernelse af nævnte hydrerede indhold fra olien er hovedformålet med vanddegummering af spiseolier.

Følgeligt omfatter olien stadig, når phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv) ovenfor, nævnte hydrerede phosphatider og mucilago.

Med andre ord beskriver fremgangsmåden ovenfor, hvis spiseolien er en ikke-vanddegummeret spiseolie, en simplificeret degummeringsmetode, som ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien, før nævnteolie bringes i kontakt med phospholipasen.

Den vandige opløsning, som omfatter mindst 85 % vand (trin ii ovenfor), omfatter fortrinsvis yderligere citronsyre. Der er fortrinsvis mellem 1-15 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning, mere fortrinsvis er der mellem 3-11 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning.

Tidsrummet i trin ii) er fortrinsvis 15-50 minutter, og mere fortrinsvis 15-30 minutter.

For yderligere detaljer angående nævnte forbehandling i trin ii) ovenfor henvises til forsøgseksemplerne heri.

- I trin iii) ovenfor justeres pH i vand/olie-emulsionen til pH 1,5-8 (for eksempel ved hjælp af tilslætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning). Dette gøres for at justere pH-værdien i olien, før phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv). Almindeligvis vil den faktiske optimale pH-værdi afhænge af hvilket enzym, der anvendes til at blive bragt i kontakt med olien i trin iv). For yderligere detaljer angående dette emne henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 5
- Almindeligvis foretrækkes det ifølge det første aspekt af opfindelsen og udførelsesformer for dette, at kontaktbringningen mellem nævnte olie og en vandig oplosning, som omfatter en phospholipase, udføres ved pH 1,5-6, mere fortrinsvis ved pH 3-6.
- 10
- pH-værdien i vandet i olie-emulsionen måles ved at udtagte 2 ml vand fra olie-emulsionen og blande dem med 2 ml vand. Efter faseseparering skal det resulterende øverste olielag pipetteres fra, og pH skal måles i vandfasen. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af følgende formel: $pH_{real} = pH_{målt} - 0,38$. For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 15
- 20
- I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er mængden af en phospholipase, som er emulgeret i olien, i intervallet 0,1-15 mg enzym (tørstof)/kg olie, mere fortrinsvis 0,25-5 mg enzym (tørstof)/kg olie og endnu mere fortrinsvis 0,25-2,5 mg enzym (tørstof)/kg olie.
- 25
- Almindeligvis er det fordelagtigt at optimere både mængden af anvendt phospholipase og den anvendte tid til enzymatisk degummering af en spiseolie til opnåelse af et phosphorindhold på under 11 ppm. Den faktiske optimale enzymdosis og tiden vil blandt andet afhænge af hvilken phospholipase, der anvendes. For yderligere detaljer vedrørende optimering af enzymdosis og tiden for fremgangsmåden henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 30
- 35
- I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet fortrinsvis til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,5-6 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 1-6 timer, mere fortrinsvis reduceres

phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,25-2,5 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

5

Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer vedrørende bestemmelsen af optimale temperaturer for individuelle phospholipaser.

10 I alle aspekter og udførelsesformer for en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet i olien fortrinsvis til mindre end 5 ppm.

15 Phosphorindholdet i olien måles som ppm (parts per million) i oliefasen i vandet, der er til stede i olieemulsionen. Analysen af phosphorindhold udføres i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7. udg. (1987)". For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er opnået fra en pattedyreart, især hvor phospholipasen er opnået fra pancreas i nævnte pattedyreart, og mest fortrinsvis hvor phospholipasen er opnået fra pancreas fra et svin.

25

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er phospholipasen fortrinsvis opnået fra en mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gær eller en bakterie.

30

Når trådsvampen, der er nævnt ovenfor, er en art af slægten *Fusarium*, er foretrukne stammer fortrinsvis stammer, såsom en stamme af *Fusarium culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *F. oxysporum*.

35

Endvidere er foretrukne stammer, når nævnte trådsvamp ovenfor er en art af slægten *Aspergillus*, stammer, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især

Aspergillus oryzae.

- Endvidere er spiseolien i en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen
5 fortrinsvis en sojabønneolie, solsikkefrøolie eller mere fortrinsvis en raspfrøolie.

Karakterisering af phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

- 10 En phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*, er blevet grundigt karakteriseret.

15 Følgeligt er et aspekt af opfindelsen fortrinsvis en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis her phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-7, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3,5-6, målt ved 40 °C, og endnu mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 4,5-5,5, målt ved 40 °C.

20 25 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat i et NEFA test bases assay eller i en buffer omfattende 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer.

30 35 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 5 kDa, endnu mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 3 kDa og mest fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 2 kDa.

Molekylemassen måles ved hjælp af SDS-PAGE-elektroforese som yderligere beskrevet i "Materialer og metoder"-afsnittet (se nedenfor).

35 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8, mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt

(pl) i intervallet 5-7,5 og endnu mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt (pl) i intervallet 5,5-7,5.

5 Det isoelektriske punkt (pl) blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

10 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; mere fortrinsvis i intervallet 30-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; og endnu mere fortrinsvis i intervallet 40-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5.

15 Temperaturopimummet for phospholipase-aktivitet blev målt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved pH 5. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

20 I endnu en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 7-11,5 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 8-11 ved 37 °C, og endnu mere fortrinsvis i pH-intervallet 8,5-11 ved 37 °C.

25 pH-optimummet for phospholipase-aktivitet blev bestemt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved 37 °C. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen omfatter fortrinsvis mindst to ud af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst tre af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, endnu mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst fire af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, og mest fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen alle fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet.

Som beskrevet ovenfor er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet klonet, udtrykt rekombinant og oprenset, og de N-terminale og C-terminale sekvenser af det aktive secernerede enzym er blevet bestemt.

5

Følgeligt angår en yderligere udførelsesform for opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, idet polypeptidet er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

- 10 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
 ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
 iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
15 iv) et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C,
 målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
 v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt
20 med lecithin som substrat ved 37 °C,

 og yderligere omfatter en aminosyresekvens, der er valgt fra gruppen, som
 omfatter:

25 (a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A og/eller B-
 enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til
 stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

 (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-
30 346 i SEQ ID NO: 2,

 (c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-
 303 i SEQ ID NO: 2,

35 (d) en analog til polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c), som er
 mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

(e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

5 I en udførelsesform for opfindelsen er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

10 10 I en yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A2-aktivitet, og i en endnu yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen en phospholipase med phospholipase B-aktivitet.

15 Fortrinsvis er nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

15 For specifikke eksempler på standardteknikker til måling af individuel PLA1-, PLA2- og/eller PLB-aktivitet henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 20 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, målt som relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som mäter frigørelse af frie fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor den forholdsmaessige andel af phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er mere end 0,25, mere fortrinsvis mere end 0,5 og mest fortrinsvis mere end 0,80.

30 30 For yderligere detaljer vedrørende måling af afhængigheden for enzymaktiviteten af Ca^{2+} -koncentrationen henvises til forsøgseksemplerne heri.

35 35 Nogle lipaser kan have begrænset phospholipase-aktivitet. I den aktuelle forbindelse defineres en sådan begrænset phospholipase-aktivitet for nævnte lipaser som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet" (se afsnittet "Definitioner" heri). Den foreliggende opfindelse angår et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet, hvor phospholipase-aktiviteten for nævnte

isolerede polypeptid er så høj, at det har industriel relevans.

- Følgeligt angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase med phospholipase-aktivitet, som er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:
- 5 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overflade af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroformopløsning,
- 10 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. $63 \text{ \AA}^2/\text{molekyle}$,
- 15 c. en bufferopløsning (som ovenfor) indeholdende 60 µg enzym injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm^2 og et volumen på 30400 mm^3) i "nul ordens-niveauet",
- 20 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, aestimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) af DDPC.
- 25

Se afsnittet "Definitioner" og forsøgseksempler heri for yderligere beskrivelser af foretrukne mængder af phospholipase-aktiviteter for et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen.

Endvidere kan den specifikke phospholipase-aktivitet for en phospholipase ifølge opfindelsen måles ved hjælp af kendte standardassays for phospholipase-aktivitet.

35 Følgeligt angår den foreliggende opfindelse i en yderligere udførelsesform et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor

phospholipasen er en phospholipase, som har en phospholipase-aktivitet, der er i stand til at frigøre mindst 7 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst 15 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, endnu mere fortrinsvis mindst 30 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym og mest fortrinsvis mindst 50 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

phospholipase-aktivitet måles i et assay, der mäter frigørelse af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, der omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

For yderligere detaljer vedrørende denne udførelsesform for opfindelsen henvises til forsøgseksemplerne heri.

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er meget egnet til udførelse af enzymatisk degummering af en spiseolie.

Følgeligt angår opfindelsen:

1. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie, ifølge en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og
2. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm), hvorved phosphorindholdet i olien reduceres til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som emulges i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

Det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er fortrinsvis i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummerede spiseolie (som defineret umiddelbart ovenfor) på mindre

end 1,5 timer og anvender mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie.

5 Et isoleret polypeptid, som fremviser phospholipase-aktivitet og har egenskaberne, der er vist ovenfor, ifølge opfindelsen opnås fortrinsvis fra en trådsvampestamme fra slægten *Fusarium*.

10 Uden at være begrænset af nogen teori forventes det imidlertid på nuværende tidspunkt, at en phospholipase ifølge opfindelsen også kan opnås fra en anden mikroorganisme, fortrinsvis en anden trådsvampestamme. Eksempler derpå er givet i afsnittet "Mikrobielle kilder" (se nedenfor).

Klonet DNA-sekvens

15 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se afsnittet "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klone en phospholipase, der fremviser PLA-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, nærmere bestemt *Fusarium oxysporum*.

20 Endvidere mener man på nuværende tidspunkt, at det er muligt at klone både en beslægtet phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA- sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning.

25 Følgeligt vedrører et aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B- aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

- (a) den phospholipase A-kodende del af polynukleotidet, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 30 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1 eller den komplementære streng dertil,
- 35 (c) en DNA-sekvens, som er mindst 70 % homolog med nævnte DNA- sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),

- (d) en DNA-sekvens som defineret i (a) eller (b), som koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, ved lav stringens,
- (f) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid med aminosyresekvenserne som resterne 1 til 346, 31 til 346 eller 31 til 303 i SEQ ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og
- (g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specifiseret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).
- 20 I denne specifikation påtænkes en henvisning, når en sådan gøres til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299, også at indbefatte den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1.
- 25 Følgeligt kan udtrykkene "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299" og "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1" bruges vilkårligt.
- 30 DNA-sekvensen kan være af genomisk, cDNA eller syntetisk oprindelse eller en hvilken som helst kombination deraf.
- Den foreliggende opfindelse omfatter også en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet og har aminosyresekvensen, der er vist som den modne del i SEQ ID NO: 2, som adskiller sig fra SEQ ID NO: 1 som følge af degenereringen af den genetiske kode.

- 5 DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, og/eller en analog sekvens ifølge opfindelsen kan klones fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, som danner enzymet med phospholipase-aktivitet, eller en anden eller beslægtet organisme som yderligere beskrevet nedenfor (se afsnittet "Mikrobielle kilder").
- 10 Alternativt kan den analoge sekvens konstrueres på basis af DNA-sekvensen, der er vist som den phospholipase-kodende del af SEQ ID NO: 1, den kan for eksempel være et udsnit deraf og/eller konstrueres ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som ikke giver anledning til en anden aminosyresekvens for phospholipasen, der kodes af DNA-sekvensen, men svarer til kodonanvendelsen for værtsorganismen, som påtænkes til produktion af enzymet, eller ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som kan give anledning til en anden aminosyresekvens (det vil sige en variant til phospholipasen ifølge opfindelsen).
- 15
- 20 Når der udføres nukleotidsubstitutioner, er aminosyre-ændringerne fortinvis af en mindre betydende type, det vil sig konservative aminosyresubstitutioner, som ikke i betydelig grad påvirker proteinets foldning eller aktivitet; små deletioner, typisk af en til ca. 30 aminosyrer; små amino- eller carboxyterminale forlængelser, såsom en aminoterminal methioninrest; et lille linkerpeptid på op til ca. 20-25 rester; eller en lille forlængelse, som letter oprensningen, såsom et polyhistidin-område; en antigen epitop eller et bindingsdomæne.
- 25
- 30 Eksempler på konservative substitutioner er inden for gruppen af basiske aminosyrer, såsom arginin, lysin, histidin; sure aminosyrer, såsom glutaminsyre og asparaginsyre, polære aminosyrer, såsom glutamin og asparagin, hydrofobe aminosyrer, såsom leucin, isoleucin, valin, aromatiske aminosyrer, såsom phenylalanin, tryptofan, tyrosin, og små aminosyrer, såsom glycin, alanin, serin, threonin, methionin. For en generel beskrivelse af nukleotidsubstitution, se for eksempel Ford et al. (1991), Protein Expression and Purification 2:95-107.
- 35 Det vil være klart for fagfolk, at sådanne substitutioner kan foretages uden for de områder, der er kritiske for molekylets funktion, og stadig resultere i et aktivt

- polypeptid. Aminosyrer, der er essentielle for aktiviteten af polypeptidet, som kodes af den klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen og derfor fortinvis ikke har været genstand for substitution, kan identificeres i overensstemmelse med kendte procedurer, såsom sekvensstyret mutagenese eller alanin-scanningsmutagenese (cf. for eksempel Cunningham and Wells (1989), *Science* 244:1081-1085). I sidstnævnte teknik indføres mutationer i hver rest i molekylet, og de resulterende mutante molekyler testes for biologisk (for eksempel phospholipase-) aktivitet til identificering af aminosyrerester, der er kritiske for molekylets aktivitet. Sites for substrat-enzym-interaktion kan også bestemmes ved hjælp af en analyse af krystalstrukturen, der bestemmes ved hjælp af teknikker, såsom nuklear magnetisk resonans-analyses, krystallografi eller fotoaffinitetsmærkning (cf. for eksempel de Vos et al. (1992), *Science* 255:306-312; Smith et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 224:899-904; Wlodaver et al. (1992), *FEBS Lett.* 309:59-64).
- 15 Polypeptider ifølge den foreliggende opfindelse indbefatter også fusionerede polypeptider eller spaltbare fusionspolypeptider, hvori et andet polypeptid er fusioneret i N-terminalen eller C-terminalen af polypeptidet eller et fragment deraf. Et fusioneret polypeptid dannes ved hjælp af fusion af en nukleinsyresekvens (eller en del deraf), som koder for et andet polypeptid, til en nukleinsyresekvens (eller en del deraf) ifølge den foreliggende opfindelse. Teknikker til frembringelse af fusionerede polypeptider er kendte og indbefatter ligering af de kodende sekvenser, som koder for polypeptiderne, således at de er i læseramme, og således at ekspression af det fusionerede polypeptid er under kontrol af den samme promotor(er) og terminator.
- 20 DNA-sekvensen ifølge opfindelsen kan klones fra stammen *Escherichia coli* DSM 11299 ved anvendelse af standard-kloningsteknikker, for eksempel som beskrevet af Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
25 Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.
- 30 Da den foreliggende opfindelse har løst problemet med udvikling af et egnet screeningsassay til anvendelse i en ekspressionskloningsteknik til kloning af en phospholipase ifølge opfindelse, se afsnittet med overskriften "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", kan DNA-sekvensen ifølge opfindelsen nu klones ved hjælp af en hvilken som helst generel metode, som inddrager:

- kloning i egnede vektorer af et cDNA-bibliotek fra en hvilken som helst organisme, der forventes at danne phospholipasen af interesse,
 - 5 - transformation af egnede gærværtsceller med nævnte vektorer,
 - dyrkning af værtscellerne under passende betingelser til ekspresion af et hvilket som helst enzym af interesse, der kodes af en klon i cDNA-biblioteket,
 - 10 - screening for positive kloner ved hjælp af bestemmelse af eventuel phospholipase-aktivitet hos enzymet, der dannes af sådanne kloner, og
 - isolering af det enzymkodende DNA fra sådanne kloner.
 - 15 Alternativt kan DNA'et, der koder for en phospholipase ifølge opfindelsen, da den foreliggende opfindelse for første gang tilvejebringer en klonet DNA-sekvens, som koder for et trådsvampe-PLA-enzym, i overensstemmelse med velkendte procedurer klones traditionelt fra en egnet kilde, såsom en hvilken som helst af organismerne, der er nævnt i afsnittet "Mikrobielle kilder", ved anvendelse af syntetiske oligonukleotidprober, der er fremstillet på basis af en DNA-sekvens, der er beskrevet heri. For eksempel kan en egnet oligonukleotidprobe fremstilles på basis af den phospholipase-kodende del af nukleotidsekvenserne, der er vist i SEQ ID NO: 1, eller et hvilket som helst egnet udsnit deraf eller på basis af aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
- Da endvidere en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, er en række af de specifikke udførelsesformer, som vedrører et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, også udførelsesformer for opfindelsen for en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet. Følgeligt vedrører referencer og foretrukne og mest foretrukne udførelsesformer for nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet også en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen.

Som følge deraf vedrører en udførelsesform for opfindelsen en klonet DNA-

sekvens ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A1.

- I en yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A2, og i en endnu yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase B.
- 10 Fortrinsvis koder for nævnte klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen et polypeptid med phospholipase A1-aktivitet.
Endvidere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, der måles som:
- 15 - relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som mäter frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er et forhold, der er større end 0,25, mere fortrinsvis et forhold, der er større end 0,5.
- 20 Endnu yderligere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, der er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkellags-phospholipase-assay som følger:
- 25 a. i et enkellags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overfalde af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroform-opløsning,
- 30 b. efter afspænding af enkeltaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for

DDPC på ca. 63 Å²/molekyle.

- 5 c. en bufferopløsning (som ovenfor), der indeholder 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cyliner med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet",

10 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget til opretholdelse af konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, aestimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

15 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelse, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, som er i stand til at frigøre mindst 7 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst 15 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

20 phospholipase-aktivitet måles i et assay, der mäter frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

25 I yderligere udførelsesformer angår opfindelsen:

en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie i overensstemmelse med en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm. og

en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm) og derved reducere phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte

olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig oplosning af phospholipasen, som er emuleret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

- 5 En klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen er fortrinsvis en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummerede spiseolie ved anvendelse af mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvorved phospholipasen er i kontakt med
10 nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

Fremgangsmåde til kloning af en trådsvampe-phospholipase

- 15 Man stødte på en række tekniske vanskelighed, da man forsøgte at isolere en phospholipase ifølge opfindelsen eller klone et polynukleotid, som kodede for den. Det syntes umuligt at isolere enzymet, og problemet med kloning af polynukleotidet blev forfulgt.

- 20 Som beskrevet heri var der ingen kendt DNA-sekvens, som kodede en trådsvampe-phospholipase A, tilgængelig. Følgeligt udviklede de foreliggende opfindere en kloningsstrategi på basis af ekspressionskloning-i-gær-teknikken (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953).

- 25 Ét af de største problemer i forbindelse med denne teknik var, at gær danner en indre aktivitet, som giver anledning til en phospholipase-baggrund i udpladningsassays. Denne baggrund viste sig at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres omhyggeligt til at niveau, hvor baggrunden var lav nok, til at assayet
30 kunne være pålideligt under ekspressionsklonings-screeningsproceduren, men høj nok til at reaktionen kan finde sted.

- 35 Ydermere omfatter trådsvampestammer almindeligvis en række forskellige lipaser, hvoraf nogle endog fremviser begrænset phospholipase-aktivitet. Sådanne lipaser defineres heri som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet (se afsnittet "Definitioner" heri).

I udpladningsassayet viste baggrunden af sådanne lipaser med phospholipase-sideaktivitet sig også at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres endnu mere omhyggeligt for at eliminere baggrundsaktiviteten fra både gærcellerne og trådsvampelipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

Ud over dette viste det sig, at der skulle foretages et omhyggeligt valg af substrat, da mange ikke tilvejebragte nogen funktionel løsning på problemet, fordi en række af de testede phospholipase-substrater gav en baggrundsaktivitet, som skyldtes, at lipaser uden phospholipase-aktivitet var i stand til at reagere på substraterne. Følgeligt skulle et stort antal substrater testes og titreres for at identificere et egnet substrat.

Den fundne løsning til muliggørelse af udførelse af ekspressionskloning af et phospholipase-kodende polynukleotid var anvendelse af Lipoid E80 (fra Lipoid GmbH) i omhyggeligt målte koncentrationer. I "Materiale og metode"-afsnittet heri findes en detaljeret beskrivelse af den komplette ekspressionskloning-i-gær-metode, herunder et udpladningsassay, som løser de ovenfor beskrevne problemer.

20 Homologi/lighed for DNA-sekvenser

DNA-sekvenshomologien/ligheden, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens fra den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 5,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,3, fremviser det kodende område af DNA-sekvensen en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, mere fortrinsvis mindst 97 % med den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1 (det vil sige position 23-1063 i SEQ ID NO: 1), eller mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 113-

1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i C-terminalt processeret sekemeret aktivt enzym).

5

Hybridisering

Hybridiseringen, der henvises til ovenfor, påtænkes at omfatte en analog DNA-sekvens, som hybridiserer til en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1063, eller mere fortinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 113-1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i det C-terminalt processerede sekemerede aktive enzym) under i det mindste lave stringens-betingelser som beskrevet detaljeret nedenfor.

10

Egnede forsøgsbetingelser til bestemmelse af hybridisering ved lav, medium eller høj stringens mellem en nukleotidprobe og en homolog DNA- eller RNA-sekvens inddrager forudgående udblødning af filteret, der indeholder DNA-fragmenterne eller RNA'et, der skal hybridisere, i 5 x SSC (natriumchlorid/natriumcitrat, Sambrook et al., 1989) i 10 minutter og

15

præhybridisering af filteret i en opløsning af 5 x SSC, 5 x Denhardt's opløsning (Sambrook et al., 1989), 0,5 % SDS og 100 µg/ml denatureret sonikeret laksesperma-DNA (Sambrook et al., 1989), efterfulgt af hybridisering i den samme opløsning, som indeholder 10 ng/ml af en vilkårlig primet (Feinberg, A.P., og Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13), ³²P-dCTP-mærket

20

(specifik aktivitet $> 1 \times 10^9$ cpm/µg) probe i 12 timer ved ca. 45 °C. Filteret vaskes herefter to gange i 30 minutter i 2 x SSC, 0,5 % SDS ved en temperatur på mindst 55 °C (lav stringens), mere fortinsvis mindst 60 °C (medium stringens), endnu mere fortinsvis mindst 65 °C (medium/høj stringens), endnu mere fortinsvis mindst 70 °C (høj stringens), endnu mere fortinsvis mindst 75 °C (meget høj stringens).

25

30

35

Molekyler, hvortil oligonukleotidproben hybridiserer under disse betingelser,

påvises ved anvendelse af en X-røntgenfilm.

Det har vist sig, at det er muligt teoretisk at forudsige om to givne DNA-
sekvenser vil hybridisere under bestemte specifikke betingelser.

5

Følgeligt kan forsøgsmetoden som et alternativ til den overfor beskrevne til
bestemmelse af, om en analog DNA-sekvens vil hybridisere til
nukleotidproben, baseres på en teoretisk beregning af den T_m
smeltetemperatur), hvorved to heterologe DNA-sekvenser med kendte
sekvenser vil hybridisere under specificerede betingelser (for eksempel med
hensyn til kation-koncentration og temperatur).

10

For at bestemme smeltetemperaturen for heterologe DNA-sekvenser
($T_m(\text{hetero})$) er det nødvendigt indledningsvis at bestemme
smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for homologe DNA-sekvenser.

15

Smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for to helt komplementære DNA-strenge
(homodupleksdannelse) kan bestemmes ved anvendelse af følgende formel:

20

$$T_m(\text{homo}) = 81,5 \text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ form}) - (500/L)$$

("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), hvor:

"M" = den molære kation-koncentration i vaskebuffer,

"% GC" = % Guanin (G) og Cytosin (C) af det totale antal baser i DNA-
sekvensen.

25

"% form" = % formamid i vaskebufferen, og

"L" = længden af DNA-sekvensen.

30

Ved anvendelse af denne formel og de eksperimentelle vaskebetingelserne,
der er angivet ovenfor, er $T_m(\text{homo})$ for homodupleksdannelsen for
nukleotidproben, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det
vil sige nukleotiderne 23-1060:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5 + 16,6(\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$$

$$T_m(\text{homo}) = 103,5 \text{ }^{\circ}\text{C}.$$

35

"M": 2 x SSC svarer til en kation-koncentration på 0,3 M,

"% GC": % GC i SEQ ID NO: 1, position 23-1060 er 56 %.

"% form": Der er intet formamid i vaskebufferen.

"L": Længden af SEQ ID NO: 1, position 23-1063 er 1038 bp.

5 Tm bestemt ved hjælp af ovennævnte formel er Tm for en homodupleksdannelse (Tm(homo)) mellem to helt komplementære DNA-
sekvenser. For at tilpasse Tm-værdien til en for to heterologe DNA-sekvenser, antager man, at en 1 % forskel i nukleotidsekvensen mellem de to heterologe sekvenser svarer til et fald på 1 °C i Tm ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995). Tm(hetero) for heterodupleksdannelsen findes derfor ved at trække homologi-%-forskellen mellem den analoge sekvens, det drejer sig om, og nukleotidproben, der er beskrevet ovenfor, fra Tm(homo). DNA-homologiprocenten, som skal trækkes fra, beregnes som beskrevet heri (se nedenfor).

10

Homologi med aminosyresekvenser

15

Polypeptidhomologien, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens for den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-
sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 3,0 og GAP-
forlængelses-afskæring på 0,1, fremviser den modne del af et polypeptid, der
kodes af en analog DNA-sekvens, en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %,
mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis
mindst 95 %, især mindst 97 % med den modne del af aminosyresekvensen,
der er vist i SEQ ID NO: 2, det vil sige position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller
mere fortrinsvis med aminosyresekvensen, der er vist i position 31-303 i SEQ
ID NO: 2 (position 303 er den C-terminale rest i C-terminalt processeret
secerneret aktivt enzym).

20

25

30

35

Den foreliggende opfindelse er også rettet mod phospholipase-varianter med en aminosyresekvens, der adskiller sig i ikke mere end tre aminosyrer, fortrinsvis i ikke mere end to aminosyrer og mere fortrinsvis i ikke mere end en aminosyre fra den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID

NO: 2.

Endvidere angår de ovennævnte foretrukne aminosyreligheder også en analog til en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, idet denne sekvens koder for et 5 polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet, og som er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der omfatter positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2.

10 Immunologisk krydsreaktivitet

Antistoffer, der skal anvendes til bestemmelse af immunologisk krydsreaktivitet, kan fremstilles ved anvendelse af en oprenset phospholipase. Mere specifikt kan der dannes antiserum mod phospholipasen ifølge 15 opfindelsen ved hjælp af immunisering af kaniner (eller andre gnavere) i overensstemmelse med proceduren, der er beskrevet af Axelsen et al. i A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter. 23, eller A. Johnstone og R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Bladkwell Scientific Publications, 1982 20 (nærmere bestemt side 27-31). Oprensede immunoglobuliner kan opnås fra antiserumet, for eksempel ved hjælp af saltfældning ($(NH_4)_2SO_4$), efterfulgt af dialyse og ionbytningskromatografi, for eksempel på DEAE-Sephadex. Immunokemisk karakterisering af proteiner kan udføres enten ved hjælp af 25 Outcherlony-dobbeltdiffusionsanalyse (O. Ouchterlony i: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), ved hjælp af kryds-immunelektroforese (N. Axelsen et al., supra, kapitel 3 og 4) eller ved hjælp af raket-immunelektroforese (N. Axelsen et al., kapitel 2).

30 Mikrobielle kilder

På prioriteringsdatoen for den foreliggende opfindelse er taksonomien, der 35 anvendes nedenfor, i overensstemmelse med World Wide Web (WWW)-NCBI-taksonomi-browseren.

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen kan opnås fra en hvilken som helst

mikroorganisme, fortinsvis en trådsvamp, en gærcelle eller en bakterie.

5 Fortinsvis kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampstamme, hvor en foretrukken række er *Ascomycota*, hvor en foretrukken klasse er *Pyrenomycetes*, som omfatter den foretrukne familie *Nectriaceae*.

10 Mere fortinsvis kan phospholipasen og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum* eller *F. solani*, især en stamme af *Fusarium oxysporum*.

15 Endvidere kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampstamme fra slægten *Aspergillus*, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især *Aspergillus oryzae*.

20 Et isolat fra en stamme af *Fusarium oxysporum*, hvorfra en phospholipase ifølge opfindelsen kan opnås, er blevet deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

25 Deponeringsdato: 6. juni 1983
Deponents ref.: NNO41759
DSM-nr.: *Fusarium oxysporum* DSM-nr. 2672

30 Endvidere er ekspressionsplasmidet pYES 2.0, som omfatter den udforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, blevet transformeret ind i en stamme af *Escherichia coli*, som blev deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

35 Deponeringsdato: 25. november 1996

Deponents ref.: NNO49279
DSM-nr.: *Escherichia coli* DSM-nr. 11299

Ekspressionsvektorer

5

Ekspressionsvektoren ifølge opfindelsen kan være en hvilken som helst ekspressionsvektor, som på bekken vis kan udsættes for rekombinant-DNA-procedurer, og valget af vektor vil ofte afhænge af værtscellen, hvori vektoren skal indføres. Vektoren kan således være en autonomt replikerende vektor, det vil sige en vektor, der findes som en ekstrakromosomal enhed, hvis replikation er uafhængig af kromosomal replikation, for eksempel et plasmid. Alternativt kan vektoren være en, der, når den indføres i en værtcelle, integreres i værtscellegenomet og replikeres sammen med kromosomet eller kromosomerne, hvori den er integreret.

15

I ekspressionsvektoren skal DNA-sekvensen, der koder for phospholipasen, være operationelt koblet til en egnet promotør- eller terminatorsekvens. Promotoren kan være en hvilken som helst DNA-sekvens, der fremviser transkriptionel aktivitet i den valgte værtscelle, og kan stamme fra gener, der koder for proteiner, som enten er homologe eller heterologe for værtscellen. Procedurerne, som anvendes til ligering af DNA-sekvenserne, der koder for phospholipasen, promotoren og terminatoren, og til insertion af disse i egnede vektorer er velkendte (cf. for eksempel Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

25

Eksempler på egnede promotorer til anvendelse i trådsvampeværtsceller er for eksempel ADH3-promotoren (McKnight et al., The EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) eller tpiA-promotoren. Eksempler på andre anvendelige promotorer er de, der stammer fra genet, der koder for *Aspergillus oryzae*-TAKA-amylase, *Rhizomucor miehei*-asparagin-proteinase, *Aspergillus niger*-neutral α -amylase, *Aspergillus niger*-syrestabil α -amylase, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus awamori*-glucoamylase (gluA), *Rhizomucor miehei*-lipase, *Aspergillus oryzae*-alkalisk protease, *Aspergillus oryzae*-triosephosphat-isomerase eller *Aspergillus nidulans*-acetamidase.

35

Værtsceller

- Den foreliggende opfindelse angår også rekombinante værtsceller, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, hvor cellerne med fordel kan anvendes i den rekombinante produktion af polypeptiderne. Udtrykket "værtscelle" omfatter et hvilket som helst afkom af en parentalcelle, som ikke er identisk med parentalcellen på grund af mutationer, der forekommer under replikation.
- Cellen transformeres fortinsvis med en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, efterfulgt af integrering af vektoren i værtskromosomet.
- "Transformation" betyder indførelse af en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge den foreliggende opfindelse i en værtscelle, således at vektoren opretholdes som en kromosomalt integreret sekvens eller som en selvreplikerende ekstrakromosomal vektor. Integrering anses almindeligvis for at være en fordel, da det er mere sandsynligt, at nukleinsyresekvensen opretholdes stabilt i cellen. Integrering af vektoren i værtskromosomet kan forekomme ved hjælp af homolog eller ikke-homolog rekombination som beskrevet ovenfor.
- I en foretrukken udførelsesform er værtscellen en svampecelle. "Svampe" indbefatter som anvendt heri rækken *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* og *Zygomycota* (som defineret af Hawksworth et al., i: Ainsworth og Bisby's Dictionary of The Fungi, 8. udgave, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) såvel som *Oomycota* (som anført i Hawksworth et al., 1995, supra, page 171) og alle mitosporiske svampe (Hawksworth et al., 1995, supra). Repræsentative grupper af *Ascomycota* indbefatter for eksempel *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) og de egentlige gær, der er anført ovenfor. Eksempler på *Basidiomycota* indbefatter paddehatte, rust og brand. Repræsentative grupper af *Chytridiomycota* indbefatter for eksempel *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* og akvatiske svampe. Repræsentative grupper af *Oomycota* indbefatter for eksempel saprolegniomycetøse akvatiske svampe (vandskimmelsvampe), såsom *Achlya*. Eksempler på mitosporiske svampe indbefatter *Aspergillus*,

Penicillium, Candida og *Alternaria*. Repræsentative grupper af Zygomycota indbefatter for eksempel *Rhizopus* og *Mucor*.

- I en foretrukken udførelsesform er svampeværtscelle en trådsvampecelle. "Trådsvampe" indbefatter alle trådagtige former af undergruppen *Eumycota* og *Oomycota* (som defineret af Hawksworth et al., 1995, supra). Trådsvampene er kendetegnet ved et vegetativt mycelium, der består af chitin, cellulose, glucan, chitosan, mannan og andre komplekse polysaccharider. Vegetativ vækst sker ved hyfal forlængelse, og carbonkatabolismen er obligat aerob. I modsætning hertil sker vegetativ vækst hos gær, såsom *Saccharomyces cerevisiae*, ved hjælp af knopskydning fra en unicellulær thallus, og carbonkatabolismen kan være fermentativ. I en mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en celle fra en art af men ikke begrænset til *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* og *Trichoderma* eller en teleomorf eller et synonym dertil. I en endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Acremonium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Mucor*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Tolypocladium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Trichoderma*-celle. I en mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus awamori*-, *Aspergillus foetidus*-, *Aspergillus japonicus*-, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus oryzae*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle fra gruppen *Discolor* (også kendt som gruppen *Fusarium*). I en anden foretrukken udførelsesform er trådsvampeparentalcellen en *Fusarium*-stamme fra udsnittet *Elegans*, for eksempel *Fusarium oxysporum*. I en anden

5 mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola insolens*- eller *Thermomyces lanuginosa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Rhizomucor miehei*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora thermophilum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora crassa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium purpurogenum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia terrestris*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er *Trichoderma*-cellen en *Trichoderma harzianum*-, *Trichoderma koningii*-, *Trichoderma longibrachiatum*-, *Trichoderma reesei*- eller *Trichoderma viride*-celle.

10

15 Svampeceller kan transformeres ved hjælp af en proces, der inddrager protoplast-dannelse, transformation af protoplassterne og regenerering af cellevæggen på en måde, der er kendt per se. Egnede procedurer til transformation af *Aspergillus*-værtsceller er beskrevet i EP 238 023 og Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474. En egnet fremgangsmåde til transformation af *Fusarium*-arter er beskrevet af Malardier et al., 1989, *Gene* 78:147-156 eller i sideløbende US serienr. 08/269 449. Gær kan transformeres ved anvendelse af procedurene, der er beskrevet af Becker og Guarente, I: Abelson, J.N., og Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology* 194:182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153:163; og Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1920. Mammaliaceller kan transformeres ved hjælp af direkte optagelse ved anvendelse af calciumphosphat-fældningsmetoden ifølge Graham og Van der Eb (1978, *Virology* 52:546).

20

25

30

Fremgangsmåde til frembringelse af phospholipase

35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til frembringelse af et isoleret enzym ifølge opfindelsen, hvorved en egnet værtscelle, som er blevet transformeret med en DNA-sekvens, der koder for enzymet, dyrkes under betingelser, der åbner mulighed for dannelsen af enzymet, og det resulterende enzym indvindes fra kulturen.

Når en ekspressionsvektor, der omfatter en DNA-sekvens, som koder for enzymet, transformeres ind i en heterolog værtscelle, er det muligt at åbne mulighed for heterolog rekombinant produktion af enzymet ifølge opfindelsen.

- 5 Derved er det muligt at opnå en stærkt oprenset phospholipase-sammensætning, som er kendtegnet ved at være fri for homologe urenheder.

I den foreliggende opfindelse kan den homologe værtscelle være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

- 10 Mediet, som anvendes til at dyrke de transformerede værtsceller, kan være et hvilket som helst traditionelt medium, som er egnet til dyrkning af de pågældende værtsceller. Den udtrykte phospholipase kan passende secereres ud i dyrkningsmediet og indvindes derfra ved hjælp af velkendte 15 procedurer, herunder separering af cellerne fra mediet ved hjælp af centrifugering eller filtrering, fældning af proteinagtige bestanddele i mediet ved hjælp af et salt, såsom ammoniumsulphat, efterfulgt af kromatografiske procedurer, såsom ionbytningskromatografi, affinitetskromatografi eller lignende.

- 20 Anvendelse af phospholipase

- 25 Foruden anvendelsen af en phospholipase i en ny fremgangsmåde ifølge opfindelse til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbart phosphor, er en række andre anvendelser af phospholipaser kendte.

Sådanne kendte anvendelser af phospholipaser er beskrevet nedenfor.

- 30 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i en hvilken som helst anvendelse, hvor det ønskes at hydrolysere fedtsyregruppen eller grupperne i et phospholipid eller lysophospholipid, såsom lecithin eller lysolecithin. Phospholipasen anvendes fortørnvis ved pH 3-10 og ved 30-70 °C (især 40-60 °C). Hvis det ønskes, kan phospholipasen inaktivieres efter reaktionen ved at udsætte den for varmebehandling, for eksempel ved pH 7, 80 °C i 1 time 35 eller 90 °C i 10 minutter.

- Som eksempel kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i fremstillingen af dej, brød og kager, for eksempel til at forbedre brødets eller kagens elasticitet. Phospholipasen kan således anvendes i en proces til frembringelse af brød, som omfatter tilsætning af phospholipasen til bestanddelene i en dej, æltning af dejen og bagning af dejen til frembringelse af brød. Dette kan udføres analogt med US 4 567 046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) eller EP 426211 (Unilever).
- 10 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan også anvendes til at forbedre filtrerbarheden af en vandig opløsning eller opslømning af碳hydratoprindelse ved hjælp af behandling af den med phospholipasen. Dette er særligt anvendeligt til en opløsning eller opslømning, som indeholder et stivelseshydrolysat, især et hvedestivelseshydrolysat, da denne har en tendens til at være vanskelig at filtrere og at give uklare filtrater. Behandlingen kan udføres analogt med EP 219 269 (CPC International).
- 20 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes til partiell hydrolyse af phospholipider, fortinsvis lecithin, til opnåelse af forbedrede phospholipid-emulgeringsmidler. Denne anvendelse beskrives yderligere i produktark til Lecitase™ (Novo Nordisk A/S), som angår brugen deraf, og i Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Udgiver: VCH Weinheim (1996)).
- 25 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes i en proces til produktion af et dyrefoder, som omfatter blanding af phospholipasen med foderstoffer og mindst ét phospholipid. Dette kan gøres analogt med EP 743 017.
- 30 Degummering af plante-/spiseolier i overensstemmelse med kendte procedurer
- 35 I overensstemmelse med kendte procedurer kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, som omfatter behandling af olien med phospholipasen til hydrolysering af hovedparten af phospholipiden og separering af en vandig fase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid fra olien. Denne proces

er anvendelig til oprensning af en hvilken som helst spiseolie, der indeholder phospholipid, for eksempel planteolie, såsom sojabønneolie, rapsfrøolie og solsikkeolie.

- 5 Før den enzymatiske behandling forbehandles planteolien fortrinsvis til fjernelse af slim (mucilago), for eksempel ved hjælp af vådraffinering. Olien vil typisk indeholde 50-250 ppm phosphor som phospholipid ved starten af behandlingen med phospholipase, og processen ifølge opfindelsen kan reducere denne værdi til under 11 ppm, mere fortrinsvis under 5 ppm.
- 10 Den enzymatiske behandling udføres ved hjælp af dispersion af en vandig oplosning af en phospholipase, fortrinsvis som små dråber med en gennemsnitlig diameter på under 10 µm. Mængden af vand er fortrinsvis 0,5-5 vægt-% i forhold til olien. Et emulgeringsmiddel kan eventuelt tilsettes.
- 15 Mekanisk bevægelse kan anvendes til opretholdelse af emulsionen.
- Den enzymatiske behandling kan udføres ved et hvilket som helst pH i intervallet 1,5-8. pH kan justeres ved hjælp af tilsetning af citronsyre, en citratbuffer eller HCl.
- 20 En passende temperatur er almindeligvis 30-70 °C (især 40-60 °C). Reaktionstiden vil typisk være 0,5-12 timer (for eksempel 2-6 timer), og en passende enzymdosis vil sædvanligvis være 100-5000 IU pr. liter olie, især 200-2000 IU/l.
- 25 Den enzymatiske behandling kan udføres batchvis, for eksempel i en tank med omrøring, eller kan være forløbende, for eksempel i en serie af omrørte reaktortanke.
- 30 Den enzymatiske behandling følges af separering af en vandfase og en oliefase. Denne separering kan udføres ved hjælp af traditionelle midler, for eksempel centrifugering.
- I andre henseender kan processen udføres i overensstemmelse med kendte principper, for eksempel analogt med US 5 264 367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM 6(12):1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol. 95(8):300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); eller

EP 654 527 (Metalgesellschaft, Röhm).

Anvendelse af en phospholipase ifølge opfindelsen til bagning

5 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i brød-forbedrende additiver, for eksempel dejsammensætninger, dejadditiver, dejkonditioneringsmidler, færdigblandinger og tilsvarende præparerter, som traditionelt tilsættes til melet og/eller dejen i løbet af processer til frembringelse af brød eller andre bagte produkter til tilvejebringelse af forbedrede egenskaber for brød eller andre bagte produkter.

10 En udførelsesform for opfindelsen angår derfor en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning og endvidere anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen i sådanne sammensætninger og en dej eller et bagt produkt, som omfatter en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen.

15 20 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykkene "brødforbedrende sammensætning" og "dejforbedrende sammensætning" at angive sammensætninger, som foruden enzymbestanddelen kan omfatter andre stoffer, som traditionelt anvendes til bagning til forbedring af dejens og/eller de bagte produkters egenskaber. Eksempler på sådanne bestanddele er anført nedenfor.

25 30 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "forbedrede egenskaber" at angive en hvilken som helst egenskab, der kan forbedres ved hjælp af virkningen af et phospholipase-enzym ifølge opfindelsen. Især resulterer anvendelsen af phospholipase i et forøget volumen og en forbedret krummestruktur og anti-"friskhedstab"s-egenskaber hos det bagte produkt, såvel som en forøget styrke, stabilitet og reduceret klæbetilbøjelighed og derved forbedret maskinbearbejdelighed hos dejen. Effekten på dejen har vist sig at være særlig god, når der anvendes en mel af ringe kvalitet. Den forbedrede maskinbearbejdelighed har særlig betydning i forbindelse med dej, der skal bearbejdes industrielt.

35 De forbedrede egenskaber vurderes ved hjælp af sammenligning med dej og/eller bagte produkter, der er fremstillet uden tilsætning af phospholipase

ifølge den foreliggende opfindelse.

- Den brød- og/eller dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen kan yderligere omfatte et andet enzym. Eksempler på andre enzymer en cellulase, en hemicellulase, en pentosanase (der er anvendelig til partiell hydrolyse af pentosaner, som øger dejens udvidelsesevne), en glucoseoxidase (der er anvendelig til at gøre dejen stærkere), en lipase (der er anvendelig til modificering af lipider, der er til stede i dejen eller dejbestanddele til blødgøring af dejen), en peroxidase (der er anvendelig til forbedring af dejkonsistensen), en protease (der er anvendelse til glutensvækkelse, især ved anvendelse af hård hvedemel), en peptidase og/eller en amylase, for eksempel α -amylase (der er anvendelig til tilvejebringelse af sukker, der kan fermenteres ved hjælp af gær).
- Endvidere eller som et alternativ til andre enzymbestanddele kan den dejforbedrende og/eller brødforbedrende sammensætning omfatte et traditionelt anvendt bagemiddel, for eksempel en eller flere af følgende bestanddele:
- Et mælkepulver (som tilvejebringer skorpefarve), gluten (til at forbedre svage meles gastilbageholdelsesstyrke), et emulgeringsmiddel (til at forbedre dejens udvidelsesevne og i nogen grad konsistensen af det resulterende brød), granuleret fedt (til blødgøring af dejen og for brødets konsistens), en oxidant (som tilsættes for at forstærke glutenstrukturen, for eksempel ascorbinsyre, kaliumbromat, kaliumiodat eller ammoniumpersulfat), en aminosyre (for eksempel cystein), en sukker og salt (for eksempel natriumchlorid, calciumacetat, natriumsulfat eller calciumsulfat, hvis funktion er at gøre dejen fastere), mel eller stivelse.
- Eksempler på egnede emulgeringsmidler er mono- eller diglycerider, diacetylvinse-estere af mono- eller diglycerider, sukker-estere af fedtsyrer, polyglycerol-estere af fedtsyrer, mælkesyre-estere af monoglycerider, eddikesyre-estere af monoglycerider, polyoxyethylenstearater, phospholipider og lecithin.
- I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "bagt produkt" at indbefatte et hvilket som helst produkt, der er fremstillet af dej, som enten har

en blød eller en sprød karakter. Eksempler på bagte produkter, hvad enten de er af hvid, lys eller mørk type, som med fordel kan fremstilles ved anvendelse af den foreliggende opfindelse, er brød (især hvidt brød, fuldkorns- eller rugbrød), typisk i form af hele brød eller kuvertbrød, fransk baguette-type brød, pitabrød, tacos, kager, pandekager, kiks, knækbrød og lignende.

5

Dejen ifølge opfindelsen kan være af en hvilken som helst af typerne, der er beskrevet ovenfor, og kan være frisk eller frosset.

10 Fra ovennævnte beskrivelse vil det fremgå, at dejen ifølge opfindelsen normalt er en surdej eller en dej, der skal symes. Dejen kan symes på forskellige måder, såsom ved hjælp af tilsætning af natriumbicarbonat eller lignende eller ved hjælp af tilsætning af en surdej (gærende dej), men det foretrækkes at syme dejen ved hjælp af tilsætning af en egnet gærkultur, såsom en kultur af *15 Saccharomyces cerevisiae* (bagegær). En hvilken som helst af de kommersielt tilgængelige *S. cerevisiae*-stammer kan anvendes.

20 I en sidste udførelsesform angår opfindelsen anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen til fremstilling af pastadej, som fortrinsvis fremstilles af durummel eller en mel af sammenlignelig kvalitet. Dejen kan fremstilles ved anvendelse af traditionelle teknikker og phospholipasen anvendes i en tilsvarende dosis, som den der er beskrevet ovenfor. Phospholipasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, for eksempel som beskrevet heri. Det påtænkes, at phospholipasen, når den anvendes til fremstilling af pasta, resulterer i en forstærkning af glutenstrukturen og således 25 en reduktion i dejens klæbetilbøjelighed og en forbedret dejstyrke.

25

Anvendelse af lipaseaktivitet hos et enzym ifølge opfindelsen

30 Som vist i forsøgseksemplerne heri kan en phospholipase ifølge opfindelsen yderligere fremvise lipaseaktivitet.

35 Følgeligt angår opfindelsen yderligere anvendelsen af denne lipaseaktivitet i standardanvendelser af en lipase, især til anvendelse i rengørings- og detergentsammensætninger. Sådanne rengørings- og detergentsammensætninger er velbeskrevne, og der henvises til WO 96/34946, WO 97/07202 og WO 95/30011 for yderligere beskrivelser af

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på 5 nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

Deponerede organismer

10 10 *Fusarium oxysporum* DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA-sekvensen ifølge opfindelsen.

15 15 *Escherichia coli* DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

20 20 Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

25 25 *E. coli*-stamme: DH10B (Life Technologies).

Plasmider

30 30 *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

pA2PH10 (se eksempel 7).

35 35 Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på 5 nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

Deponerede organismer

10 *Fusarium oxysporum* DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA- sekvensen ifølge opfindelsen.

15 *Escherichia coli* DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

20 Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MAT α ; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir $+$).

E. coli-stamme: DH10B (Life Technologies).

25 Plasmider

30 *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

pA2PH10 (se eksempel 7).

35 Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

Den enzymaktivitet, der er nødvendig til frembringelse af 1 μ mol fedtsyre pr. minut fra enzymreaktionen, defineredes som 1 enhed.

Ekspressionskloning i gær

5

Ekspressionskloning i gær blev udført som beskrevet udførligt af H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), der medtages heri som reference.

10 Alle individuelle trin i ekstraktion af totalt RNA, cDNA-syntese, mungbønnenuleasebehandling, stump-endedannelse med T4-DNA-polymerase og konstruktion af biblioteker blev udført i overensstemmelse med referencerne, der er nævnt ovenfor.

15 Fermenteringsprocedure af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 til mRNA-isolering

20 *Fusarium oxysporum* DSM 2672 blev dyrket i YPD-medium i 4 dage ved 30 °C. 10 μ l supernatant blev testet for phospholipase-aktivitet i upladningsassayet, der er beskrevet nedenfor.

mRNA blev isoleret fra mycelium fra denne kultur som beskrevet i H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953.

25 Identificering af positive gærkloner (upladningsassay)

Identificering af positive gærkloner (det vil sige kloner, som omfatter et gen, der koder for phospholipase-aktivitet) blev udført som beskrevet nedenfor.

30 Gærtransformanterne uplades på SC-agar, der indeholder 2 % glucose, og inkuberes i 3 dage ved 30 °C. Et celluloseacetat-filter (OE67, Schleicher & Schuell) anbringes ovenpå cellerne og overføres herefter til skålene, der indeholder SC-agar og 2 % galactose med cellerne ovenpå filteret. Efter 3 dages inkubation ved 30 °C overføres filteret med celler til substratskål. 35 Positive kloner identificeres som kolonier, der fremkalder en blågrøn zone i substratskålen under kolonien.

- Substratskålene er fremstillet på følgende måde: 2,5 g agar (BA-30 INA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) tilsættes til 137,5 ml H₂O, opvarmet til kogning i en mikrobølgeovn. Efter nedkøling til ca. 60 °C tilsættes 30 ml af følgende blanding: 62,5 ml 0,4 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) og 50 ml 3 % Lipoïd E80 (Lipoïd GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Tyskland), som er opløst i 2 % Triton X-100 (volumen/volumen), og 0,5 ml 2 % Brilliant Green-opløsning i H₂O. Koncentrationen af substratet er vigtig. Hvis koncentrationen er for høj, kan det give anledning til baggrundsaktivitet fra gærceller og/eller fra trådsvampelipaser med phospholipase-sideaktivitet.
- 10 Isolering af et cDNA-gen til ekspression i *Aspergillus*
- En phospholipase-producerende gærkoloni podes i 20 ml YPD-medium i et 50 ml-glas-reagensglas. Reagensglasset rystes i 2 dage ved 30 °C. Cellerne høstes ved hjælp af centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm.
- 15
- 20 DNA isoleres ifølge WO 94/14953 og oploses i 50 ml vand. DNA'et transformeres ind i *E. coli* ved hjælp af standardprocedurer. Plasmid-DNA isoleres fra *E. coli* ved anvendelse af standardprocedurer og analyseres ved hjælp af restriktionsenzymanalyse. cDNA-insertet skæres ud ved anvendelse af passende restriktionsenzym og ligeres ind i en *Aspergillus*-ekspressionsvektor.
- 25 Transformation af *Aspergillus oryzae* eller *Aspergillus niger*
- Protoplaster kan fremstilles som beskrevet i WO 95/02043, side 6, linie 2 - side 17, linie 12, der medtages heri som reference.
- 30 100 µl af protoplast-suspensionen blandes med 5-25 µg af det behørige DNA i 10 µl STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Protoplaster blandes med p3SR2 (et *A. nidulans*-amdS-gen-indeholdende plasmid). Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter. 0,2 ml 60 % PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, tilsættes og blandes omhyggeligt (to gange), og til sidst tilsættes 0,85 ml af den samme oplosning og blandes omhyggeligt. Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter, centrifugeres ved 2500 x g i 15 minutter, og pelleten resuspenderes i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter endnu en sedimentering spredes
- 35

5 protoplasterne i minimale skåle (Cove, Biochem. Biophys. Acta (1966), 113:51-56), som indeholder 1,0 M sucrose, pH 7,0, 10 mM acetamid som nitrogen-kilde og 20 mM CsCl til hæmning af baggrundsvækst. Efter inkubation i 4-7 dage ved 37 °C udtages sporer og spredes til enkeltkolonier. Denne procedure gentages, og sporer fra en enkeltkoloni efter den anden reisolering opbevares som en defineret transformant.

Test af *Aspergillus oryzae*- eller *Aspergillus niger*-transformanter

10 Hver af *Aspergillus oryzae*-transformanterne podes i 10 ml YPM (cf. nedenfor) og opformeres. Efter 2-5 dages inkubation ved 30 °C fjernes supernatanten. 20 µl supernatant påføres i huller, der er stukket i substratpladen (se ovenfor). Efter 1-24 timer viser phospholipase-aktivitet sig som en blågrøn zone omkring hullet.

15

Tilførsels-batchfermentering

20 Tilførsels-batchfermentering blev udført i et medium, som omfattede maltodextrin som carbonkilde, urinstof som nitrogenkilde og gærekstrakt. Tilførsels-batchfermenteringen blev udført ved hjælp af podning af en rystekolbekultur af *A. oryzae*-værtsceller af interesse i en medium, som omfattede 3,5 % af carbonkilden og 0,5 % af nitrogenkilden. Efter 24 timers dyrkning ved pH 7,0 og 34 °C blev den fortløbende tilførsel af yderligere carbon- og nitrogenkilder indledt. Carbonkilden blev holdt som den begrænsende faktor, og det blev sikret, at der var oxygen til stede i overskydende mængder. Tilførsels-batchdyrkningen blev fortsat i 4 dage.

25

Isolering af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1

30 Den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, som koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, kan opnås fra den deponerede organisme *Escherichia coli* DSM 11299 ved hjælp af ekstraktion af plasmid-DNA ved hjælp af kendte metoder (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

35

Medier

YPD: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % glucose (sterifiltreret) tilsat.

5 YPM: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % maltodextrin (sterifiltreret) tilsat.

10 x basalsalt: 75 g gær-nitrogenbase, 113 g ravsyre, 68 g NaOH, H₂O til 1000 ml, sterifiltreret.

10 SC-URA: 100 ml 10 x basalsalt, 28 ml 20 % casaminosyrer uden vitaminer, 10 ml 1 % tryptophan, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 3,6 ml 5 % threonin og 100 ml 20 % glucose eller 20 % galactose tilsat.

15 SC-agar: SC-URA, 20 g/l agar tilsat.

SC-variantagar: 20 g agar, 20 ml 10 x basalsalt, H₂O til 900 ml, autoklaveret.

PEG 4000 (polyethylenglycol, molekylevægt = 4.000) (BDH, England).

20 EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

25 Fermentering af *Fusarium oxysporum*-phospholipase

En kultur af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 på et skråstivnet agarsubstrat blev overført til fem 500 ml-rystekolber, hver med 100 ml Bouillon-3-medium, og omrystet ved 30 °C i 1 dag (200 rpm, amplitude 2,5 cm).

30 Sammensætningen af Bouillon-3-medium var som følger:

	Pepton	6 g/l
	Trypsinfordøjet kasein	4 g/l
35	Gærekstrakt	3 g/l
	Kødestrakt	1,5 g/l
	Glucose	1 g/l

Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

5 Dyrkningsmediet fra disse Boullion-3-rystekolber blev anvendt som podekultur til podning af tyve 500 ml-rystekolber, hver med 200 ml PL-1-medium.

Sammensætningen af PL-1-mediet var som følger:

	Pepton	10 g/l
10	Tween®-80	12 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g/l
	pH før autoklavering	6,0

15 Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

20 Hver PL-1-rystekolbe blev podet med 0,5-2 ml Boullion-3-dyrkningsmedium og rystet ved 200 rpm (amplitude 2,5 cm) ved 30 °C i 5 dage. Dyrkningsmediet fra rystekolberne blev puljet ved høst til opnåelse af 3,9 l med et enzymudbytte på 53 LU/ml.

EKSEMPEL 2

Oprensning af phospholipase

25 Trin 1) Én liter fermenteringssupernatant blev centrifugeret, og det resulterende præcipitat blev smidt ud. Supernanten blev herefter justeret til 0,8 M ammoniumacetat ved hjælp af tilsætning af fast ammoniumacetat.

30 Trin 2) Hydrofobisk kromatografi - Toyopearl butyl 650 C-matrix blev leveret af Toso Hass (Röhm and Haas Company, Tyskland). En 50 ml-søjle blev pakket med matrixen. Søjlen blev vasket med 50 % ethanol og efterfølgende med vand. Søjlen blev herefter ækvilibreret med 0,8 M ammoniumacetat. Fermenteringssupernanten, som var justeret med 0,8 M ammoniumacetat, blev herefter påsat søjlen. Ubundet materiale blev herefter vasket med 0,8 M ammoniumacetat, indtil alt UV-absorberende materiale (280 nm) var fjernet.

Søjlen blev herefter elueret med vand og efterfølgende med 50 % ethanol.

5 Phospholipase-aktivitet blev bestemt ved pH 4,5 og 40 °C ved anvendelse af Nefa-kittet som beskrevet ovenfor. Fraktioner, som indeholdt aktivitet i vand- og alkohol-eluat, blev puljet. Aktiviteten blev målt ved pH 4,5 ved anvendelse af et Nefa-kitassay.

10 Fraktioner, som indeholdt phospholipase-aktivitet, blev herefter puljet og dialyseret og opkoncentreret ved anvendelse af en Amicon-ultrafiltreringsmembran med en afskæring på 10 kDa.

Trin 3) Negativ absorption på DEAE-hurtigflowkromatografi.

15 DEAE FF blev købt ved Pharmacia, og en 50 ml søje blev pakket med matrixen.

Søjlen blev herefter vasket som beskrevet af producenten og ækvilibreret med 25 mM Tris-acetatbuffer, pH 7.

20 Den dialyserede og opkoncentrerede prøve blev herefter justeret til pH 7 og konduktans 2 mSi og påsat en DEAE FF-anionbytningssøje. Aktivitet blev opsamlet som effluent. Aktiviteten binder ikke til en anionbytter ved pH 7.

25 Effluenten fra DEAE FF, som indeholdt aktivitet, blev opkoncentreret og dialyseret ved anvendelse af en Amicon-membran med en afskæring på 10 kDa og en 25 mM natriumacetat-buffer, pH 6.

30 Gelfiltrering på Superdex 75.
Superdex 75-førpakket søje Hiload Tm 16/60 fra Pharmacia blev vasket og ækvilibreret med 25 mM natriumacetat, pH 6, som indeholdt 150 mM NaCl.

35 To ml af den opkoncentrerede effluent fra anionbytteren, som fremviste phospholipase-aktivitet ved pH 4,5 og 40 °C, blev påsat Superdex-søjen.

Aktiviteten blev separeret fra ved hjælp af gelfiltrering med en flowhastighed

på 1 ml/minut.

EKSEMPEL 3

- 5 Karakterisering af oprenset phospholipase, som er opnået fra *Fusarium oxysporum*

10 En karakterisering som beskrevet nedenfor blev udført på en *Fusarium oxysporum*-phospholipase, der var fermenteret som beskrevet i eksempel 1 og oprenset som beskrevet i eksempel 2.

15 Molekylevægten for phospholipase-enzymet blev bestemt ved anvendelse af færdigstøbte 4 til 20 % SDS-PAGE-geler fra Novex Tm. Proteinets molekylevægt blev bestemt under reducerende betingelser som beskrevet tidligere.

For *F. oxysporum*-phospholipase viste molekylevægten sig at være 29-30 kDa under reducerende betingelser.

20 Det isoelektriske punkt blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia.

For *F. oxysporum* viste pl for proteinet sig at være omkring neutralt pH, fortinsvis i intervallet 5,8 til 6,8.

- 25 Phospholipases termostabilitet

30 Termostabiliteten for phospholipase fra *Fusarium oxysporum* blev testet ved hjælp af DSC (differentiel scanningskalorimetri). Den termale denatureringstemperatur, T_d , blev aflæst som spidsen af denatureringstoppen i termogrammer (C_p vs. T), der opnåedes efter opvarmning af enzymopløsninger ved en konstant, programmeret opvarmningshastighed.

Eksperimentelt

- 35 En DSC II fra Hart Scientific (Utah, US, 1993) blev anvendt til forsøgene.

50 mM bufrede oplosninger blev anvendes som oplosningsmiddel for enzymet

(ca. 2 mg/ml) ved enten pH 10 (50 mM glycinbuffer), pH 7 (50 mM HEPES-buffer + 10 mM EDTA) eller pH 4 (50 mM citratbuffer). Enzym blev oprenset ifølge eksempel 2 ovenfor.

- 5 750 µl enzymopløsning blev overført til 1 ml forsejelige standard-hastelloy-ampuller fra Hart Scientific. Ampuller blev indført i kalorimeteret og nedkølet til 5 °C i 15 minutter. Der blev foretaget termal ækvilibrering før DSC-scanningen. DSC-scanningen blev udført fra 5 °C til 95 °C ved en scanningshastighed på ca. 90 K/time. Denatureringstemperaturer blev bestemt ved en nøjagtighed på
10 ca. ± 2 °C.

Resultater:

TABEL 1: Spids af denatureringstop som funktion af pH

pH	Td(°C)
4	57 °C
7	62 °C
10	<u>55 °C</u>

- 20 Det skal bemærkes, at disse forsøg blev udført i fravær af en oliematrix, som kan influere betydeligt på enzymstabilitet. DSC-resultaterne viser en maksimal stabilitet i nærheden af neutralt pH.

- 25 Hvis man forudsætter irreversibel termal denaturering, er en relevant arbejdstemperatur ved industriel anvendelse, såsom degummering af olier (US 5 264 367), mindst ca. 10 grader lavere end Td-temperaturene, der er anført i tabel 1 ovenfor.

30 Aminoterminal sekvens

Aminoterminal analyse blev udført ved anvendelse af Edman-degradering med Applied Biosystem-udstyr (ABI 473A protein sequencer, Applied Biosystem, USA) som beskrevet af producenten.

- 35 N-terminal(e) sekvens(er):

For *Fusarium oxysporum*-phospholipasen er den N-terminale sekvens:

N-terminal A-V-G-V-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

- 5 Den N-terminale aminosyre "A" (Ala) er position 31 i SEQ ID NO: 2. Dette viser, at det modne phospholipase-enzym ifølge opfindelsen starter i position 31 i SEQ ID NO: 2.

Følgeligt er den modne sekvens fra 31-346 i SEQ ID NO: 2.

10

EKSEMPEL 4

Phospholipase A-aktivitet

- 15 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nef-a-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant phospholipase A-aktivitet ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

20

EKSEMPEL 5

Aktivitet mod L-a-lysophosphatidylcholin

- 25 Phospholipase-aktiviteten blev bestemt emd L-a-lysophosphatidylcholin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nef-a-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant aktivitet mod L-a-lysophosphatidylcholin ved betingelseme, der er beskrevet ovenfor.

30

EKSEMPEL 6

Phospholipase-aktivitet i enkeltlags-opsætning

- 35 Et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau, KSV5000, KSV Instruments, Finland) er blevet anvendt til måling af forskellige enzymers aktivitet mod phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin).

Forsøg

5 På den grundigt oprensede overflade af en bufferopløsning (10 mM TRIS, pH 8,0, 25 °C) blev et enkeltlag af DDPC spredt fra en chloroform-opløsning. Efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m, som svarer til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle. En bufferopløsning (se ovenfor), som indeholder ca. 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen af reaktionsdelen (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet". Enzymatisk aktivitet manifesterer sig ved hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter. Efter at have verificeret, at den vandige opløselighed af reaktionsprodukterne (kaprinsyre og DDPC) er betydelig højere end for DDPC, aestimeres antallet af 10 DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut ved hjælp af enzymet, ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

15

Resultater

20

TABEL 2. Enzymers aktivitet mod DDPC i en enkeltlags-opstilling

	Enzym	Aktivitet ² (nmol/min)
25	Sigma P9279 (PLA2 fra bigift, 850 U/mg)	1,9
	Enzym fra <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
	<i>Candida antarctica</i> -B bestanddels-lipase	0
	<i>Candida antarctica</i> -A bestanddels-lipase	0
30	Rekombinant marsvinepancreas-lipase (rGPL)	0,2
	Lipolase® (Novo Nordisk A/S)	< 0,1

² Beregnet ud fra reduktion i enkeltlag-areal pr. tidsenhed, induceret ved hjælp af tilstedeværelse af enzym.

35

"Enzym fra *Fusarium oxysporum*" i tabel 2 er en phospholipase ifølge opfindelsen, der er oprenset som beskrevet i eksempel 2.

Konklusion

Der blev ingen phospholipase-aktivitet påvist for de fleste af enzymerne, bortset fra lipaser, der er opnået fra marsvinelipase, som viste mindre phospholipase-aktivitet.

5

Phospholipasen ifølge opfindelsen, der var opnået fra *Fusarium oxysporum*, viste overraskende høj signifikant phospholipase-aktivitet.

10

Følgeligt defineres i den foreliggende opfindelse udtrykket "phospholipase-aktivitet", der anvendes heri i forbindelse med en phospholipase ifølge opfindelsen, som en aktivitet, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist ovenfor, er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg. Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal, der specificerer phospholipase-aktivitet.

15

20

25

Et eksempel på en lipase med phospholipase-sideaktivitet ifølge definitionerne heri er marsvine-lipasen, der er vist i tabel 2 ovenfor. Nævnte marsvine-lipase har en phospholipase-sideaktivitet i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er mindre end 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg.

EKSEMPEL 7

30

Kloning og ekspression af en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672

35

Kloning og ekspression blev udført ved anvendelse af ekspressionskloning-i-gær-teknikken som beskrevet ovenfor.

mRNA blev isoleret fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, der var dyrket som beskrevet ovenfor, herunder bevægelse for at sikre tilstrækkelig tilførsel.

5 Mycelia blev høstet efter 3-5 dages vækst, straks nedfrosset i væskeformig nitrogen og opbevaret ved -80 °C. Et bibliotek fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, som bestod af ca. 9×10^5 individuelle kloner, blev konstrueret i *E. coli* som beskrevet med en vektorbaggrund på 1 %. Plasmid-DNA fra nogle af puljerne blev transformeret ind i gær, og der opnåedes 50-100 skåle, som indeholdt 250-400 gærkolonier, fra hver pulje.

10 Phospholipase-positive kolonier blev identificeret og isoleret i substratskåle (se ovenfor). cDNA-inserts blev amplificeret direkte fra gærkolonierne og karakteriseret som beskrevet i Materialer og metoder-afsnittet ovenfor. DNA-sekvensen for cDNA'et, der koder for phospholipasen, er vist i SEQ ID NO: 1, og den tilsvarende aminosyresekvens er vist i SEQ ID NO: 2. I SEQ ID NO: 1 definerer DNA-nukleotiderne fra nr. 23 til nr. 1060 det phospholipase-kodende område. Den del af DNA-sekvensen i SEQ ID NO: 1, som koder for den modne del af phospholipasen, omfatter positionerne 113 til 1060, der svarer til aminosyrepositionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2.

15 cDNA'et er opnåeligt fra plasmidet i DSM 11299.
20 Totalt DNA blev isoleret fra en gærkoloni, og plasmid-DNA blev indvundet ved hjælp af transformation af *E. coli* som beskrevet ovenfor. For at udtrykke phospholipasen i *Aspergillus* blev DNA'et fordøjet med passende restriktionsenzym og størrelsesfaktioneret på gel, og et fragment, som svarede til phospholipasegenet, blev oprenset. Genet blev efterfølgende ligeret til pH414 og fordøjet med passende restriktionsenzym til opnåelse af plasmidet pA2PH10.

25 Efter amplifikation af DNA'et i *E. coli* blev plasmidet transformeret ind i *Aspergillus oryzae* som beskrevet ovenfor.
30 Test af *A. oryzae*-transformanter

35 Hver af transformanterne blev testet for enzymaktivitet som beskrevet ovenfor. Nogle af transformanterne havde en phospholipase-aktivitet, som var signifikant højere end *Aspergillus oryzae*-baggrunden. Dette viser effektiv ekspression af phospholipasen i *Aspergillus oryzae*.

EKSEMPEL 8Rekombinant ekspression af en *Fusarium oxysporum*-phospholipase

- 5 En *A. oryzae*-transformant, som omfattede *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pA2PH10 (se eksempel 7), blev tilførsels-batchfermenteret som beskrevet ovenfor. Oprensning af den rekombinant producerede *F. oxysporum*-phospholipase blev udført som beskrevet i eksempel 2.

10 EKSEMPEL 9Karakterisering af en rekombinant udtrykt og oprenset phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

- 15 Karakteriseringen blev udført på en rekombinant udtrykt og efterfølgende oprenset *Fusarium oxysporum*-phospholipase (se eksempel 8).

Disse karakteriseringsresultater med hensyn til den rekombinante *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen svarer perfekt overens med 20 karakteriseringsresultaterne, der er vist i eksempel 3, hvor det blev vist, at det rekombinant udtrykte og oprensede enzym var det samme som den ikke-rekombinant udtrykte og oprensede phospholipase, der blev karakteriseret i eksempel 3.

- 25 Generelle assays, som anvendes til at karakterisere en rekombinant produceret phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*

Phospholipase-assays

- 30 Phospholipase-aktivitet (PHLU) blev målt som frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin. 50 µl 4 % L-a- phosphatidylcholin (plante-lecithin fra Avanti, USA), 45 % Triton X-100, 5 mM CaCl₂ i 50 mM HEPES, pH 7, blev tilsat, 50 µl enzymopløsning, som var fortyndet til en passende koncentration i 50 mM HEPES, pH 7. Prøverne blev inkuberet i 10 minutter ved 30 °C, og reaktionen blev standset ved 95 °C i 5 minutter før centrifugering (5 minutter ved 7000 rpm). 35 Fri fedtsyrer blev bestemt ved anvendelse af Nef-a C-kittet fra Wako Chemicals GmbH; 25 µl reaktionsblanding blev tilsat til 250 µl reagens A og inkuberet i 10

5 minutter ved 37 °C. Herefter blev 500 µl reagens B tilsat, og prøven blev inkuberet igen, 10 minutter ved 37 °C. Absorptionen ved 550 nm blev målt ved anvendelse af et HP 8452A dioderække-spektrofotometer. Prøver blev analyseret mindst in duplo. Substrat- og enzymblindprøver (forvarmede enzymprøver (10 minutter ved 95 °C) + substrat) blev indbefattet. Oleinsyre blev anvendt som fedtsyrestandard. 1 PHLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til af frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut under disse betingelser.

10 Alternativt blev assayet kørt ved 37 °C i 20 mM citratbuffer, pH 5 (Ca²⁺-afhængighed) eller 20 mM Britton-Robinson-buffer (pH-profil/temperaturprofil/stabilitet).

15 Phospholipase A1-aktivitet (PLA1) blev målt ved anvendelse af 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin (D3761 Molecular Probes) som substrat. 190 µl substrat (100 µl D3761 (2 mg/ml i ethanol) + 50 µl 1 % Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl₂, pH 7) i en 200 µl-kuvette blev tilsat 10 µl enzym, og absorptionen ved 410 nm blev målt som funktion af tiden på HP 8452A-dioderække-spektrofotometeret ved stueterminatur. Aktivitet blev beregnet som kurvens hældning i det lineære område. PLA1 svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre (thiol)/minut ved disse betingelser.

20 Phospholipase A2-aktivitet (PLA2) blev målt ved 40 °C ved anvendelse af 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (H361 Molecular Probes). 2 ml substrat (50 µl 1 % Triton X-100 + 25 µl 0,1 % H361 i methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) i en 2 ml-kuvette med omrøring blev tilsat 10 µl enzym, og pyren-fluorescens-emissionen blev målt ved 376 nm (excitation ved 340 nm) som funktion af tiden (1 sekund-intervaller) ved anvendelse af Perkin Elmer LS50-apparatet. I Triton X-100/phospholipid-micellerne blev koncentrationen af phospholipid justeret til at have excimer-dannelse (emitterer ved 480 nm). Ved spaltning frigøres fedtsyren i 2-positionen, som indeholder pyrengruppen, til vandfasen, hvilket resulterer i en stigning i monomer-emissionen. PLA2 blev beregnet som hældningen af kurven i det lineære område ved tilsvarende betingelser.

35 Lipase-assays

Lipase-aktivitet (LU) blev målt ifølge Novo Nordisk publikation AF 95. Hydrolysen af tributyrin ved 30 °C og pH 7 blev efterfulgt af et pH-stat-titreringsforsøg. 1 LU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol smørsyre/minut under standardbetingelser.

5

Aktivitet på olivenolie (SLU) blev målt som følger: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9, blev tilsat til 2,5 ml Sigma Lipase-substrat. pH blev justeret til pH 9 eller lige under før tilsætning af 0,5 ml lipase-opløsning (fortyndet i buffer) og udførsel af et pH-stat-titreringsassay ved 30 °C ved anvendelse af Titralab, som er kommersielt tilgængeligt fra Radiometer A/S, København, Danmark. 1 SLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut ved pH 9, 30 °C.

10

15 Karakterisering af en rekombinant fremstillet *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

Assayene, som blev anvendt til karakterisering af enzymerne, der er nævnt nedenfor, var assayene, der er beskrevet umiddelbart ovenfor.

20

Enzymer

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

25

Batch F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

Enzymet blev rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Lecitase™ Batch L546-F06 (10368 IU/ml, ca. 20 mg/ml). Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

30

Ca²⁺'s indflydelse på phospholipase-aktiviteten hos *F. oxysporum*-lipase-phospholipase blev undersøgt. Der observeredes ingen større forskel, uanset om EDTA eller Ca²⁺ var indbefattet i assayet eller ej (se tabel 3 nedenfor), og enzymet synes således at være relativt uafhængigt af Ca²⁺.

35

TABEL 3. *F. oxysporum*-phospholipase-aktivitets (PHLU) afhængighed af EDTA og CaCl₂ - 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5 ved 37 °C

	5 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂
--	--------------	--------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------

Relativ aktivitet ¹	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89
--------------------------------	------	------	---	------	------	------

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved 1 mM CaCl₂, der er normaliseret til 1.

- 5 pH-profilen blev undersøgt i Britton-Robinson-buffer ved anvendelse af plante-lecithin som substrat (tabel 4). Selvom enzymet viser en alkalisk pH-profil på phospholipid med et optimum ved pH 9 eller højere, er aktiviteten stadig tilstrækkelig høj til tilvejebringelse af degummering af olie ved lavt pH og anvendelse ved bagning (se nedenfor for en sammenligning af specifikke aktiviteter).

10

TABEL 4. *Fusarium oxysporum*-phospholipases pH-profil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR, 37 °C

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Relativ aktivitet ¹	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved pH 9, der er normaliseret til 1.

- 5 Temperaturprofiler for phospholipasen opnåedes ved pH 5; aktiviteten begynder at falde ved temperaturer over 40 °C (tabel 5). Dette er i rimelig overensstemmelse med temperaturstabiliteten, der måles ved præinkubering af enzymet og efterfølgende måling af residual-aktivitet (tabel 6), hvor enzymet er stabilt ved temperaturer op til 45 °C ved pH 5.

10

TABEL 5. *F. oxysporum*-phospholipase's temperaturprofil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR

	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

Alle data er vist som relative aktivitetsdata i forhold til aktiviteten ved pH 5, 40 °C, der er normaliseret til 1.

15

TABEL 6. *Fusarium oxysporum*-phospholipases temperaturstabilitet; præinkubation 30 minutter i 20 mM BR

	5 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Alle data er vist som residualaktivitetsdata, hvor aktiviteten efter præinkubation ved 5 °C er normaliseret til 1.

20

Enzymets lave stabilitet kan være fordelagtig til registrering af et eventuelt produkt som en proceshjælp, da det aktive enzym ikke bør forventes i slutproduktet ved hverken degummering af spiseolier eller i bagte produkter.

25

Phospholipasen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen, har både phospholipase- og lipase-aktivitet.

Følgeligt blev enzymets aktivitet på forskellige lipase- og phospholipase-substrater undersøgt og sammenlignet med aktiviteten hos den kommersielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ og den kommersielt tilgængelige lipase Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

5

F. oxysporum-phospholipase/lipasen har høj aktivitet på både tributyrin og olivenolie ved pH 7 og 9 (tabel 7). Til sammenligning er den specifikke aktivitet hos Lipolase® ca. 5000 LU/mg. Imidlertid fremviser *F. oxysporum*-lipasen i modsætning til Lipolase® en meget bredere specificitet med betydelig phospholipase-aktivitet og også thioesterase-aktivitet (se enkeltdags-eksempel 6 ovenfor, som viser, at Lipolase® ikke har en målbar phospholipase-aktivitet).

10

F. oxysporum-phospholipase/lipasen ifølge opfindelsen har en specifik aktivitet på lecithin, som er betydelig højere end den hos phospholipasen Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) ved pH 7 (tabel 7).

15

Sammenlignet med Lecitase™ har *F. oxysporum*-enzymet en 100 gange højere aktivitet ved pH 7. Phospholipase:lipase-forholdet for *F. oxysporum*-enzymet er ca. 0,225 (1000 LU/mg/225 PHLU/mg) under tilsvarende betingelser (pH 7 og 30 °C).

20

TABEL 7. *F. oxysporum*-lipase/phospholipasens aktivitet - sammenligning med Lecitase™

Enzym	LU/mg	PLU ¹ /mg	PHLU/mg	SLU/mg	PLA1/mg
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase™	<0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

25

¹PLU blev målt i lighed med PHLU men i 20 mM citrat, pH 5 og ved 37 °C i stedet for 50 mM HEPES, pH 7 ved 30 °C.

30

F. oxysporum-lipase/phospholipasens specificitet blev undersøgt ved anvendelse af substrater, der er specifikke for phospholipase A1, ved måling af spaltningen af thioester-bindingen i 1-positionen i 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin.

Enzymet hydrolyserer klart 1-positionen i phospholipid (tabel 7), mens Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) som forventet ikke viste aktivitet på dette

substrat.

C-terminal aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen ifølge opfindelsen

5

Den N-terminale aminosyresekvens for det rekombinant udtrykte modne phospholipase-protein blev bestemt som beskrevet i eksempel 3, og det blev fastslået, at denne N-terminale sekvens var den samme som bestemt for det ikke-rekombinant dannede og oprensede enzym (se eksempel 3).

10

MALDI-TOF-massespektrometri blev udført ved anvendelse af et VG TofSpec-massespektrometer (Micromass, Manchester, UK) som beskrevet i Christgau et al., Biochem. J. 319:705-712, 1996.

15

Baggrund

Den N-terminale aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen, som er udledt fra DNA-sekvensen, forudser i kombination med den kendte N-terminale aminosyresekvens for den modne phospholipase et protein på 315 aminosyrerester (aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2). Den teoretiske masse for dette udledte protein er 33.256,8 Da.

20

25

Ved anvendelse af MALDI-TOF-massespektrometri har vi tidligere bestemt massen af den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* til at være 28,2 kDa (data ikke vist), og på SDS-PAGE viste det sig, at molekylevægten er 29-30 kDa (se ovenfor).

30

Da de N-terminale sekvenser for den native og den rekombinante *F. oxysporum*-lipase er identiske, er det sandsynligt, at masgeforskellen, som ses mellem den udledte masse og den eksperimentelle masse, er forårsaget af C-terminal processering.

35

For at undersøge dette har vi isoleret det C-terminale peptid fra den rekombinante *F. oxysporum*-lipase, som er udtrykt i *A. oryzae*, og sekventeret det gennem dets C-terminal.

Strategi

5 Den gennemsnitlige masse for den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* på 28,2 kDa kan anvendes til at forudsige den mest sandsynlige C-terminale rest, som viser sig at være Ser303 (SEQ ID NO: 2).

10 Denne forudsigelse er baseret på den formodning, at enzymet er ikke-glycosyleret. Det enkelte potentielle N-glycosyleringssite, som findes i sekvensen i Asn163, anvendes sandsynligvis ikke, da der findes en Pro-rest i position 164. Tilstedeværelsen af en Pro-rest i den anden rest i konsensussekvensen for N-glycosylering (Asn-Xaa-Ser/Thr) er aldrig blevet rapporteret. Endvidere tyder formen af toppen i massespektret ikke på glycosylering. Toppen er imidlertid bredere, end man sædvanligvis oplever for homogene proteiner, hvilket indikerer muligheden for størrelsesheterogenitet. 15 Da enzymets N-terminal er veldefineret, er størrelsesheterogeniteten mest sandsynligt forårsaget af heterogen C-terminal processering.

20 En gennemgang af SEQ ID NO: 2 (se nedenfor) viser, at den udledte C-terminal er placeret tæt på den sidste af de 8 Cys-reste i sekvensen. Indførelse af en radioaktiv tag på Cys-resterne gør peptiderne, der indeholder Cys-reste, lette at spore gennem peptidoprensning. En kombination af den radioaktive tagging med proteolytisk degradering ved anvendelse af Asp-N-proteasen, som spalter foran Asp-reste, vil resultere i et tagget C-terminalt peptid. Endvidere vil tre indre peptider blive tagget. Sekventering af alle 25 taggede peptider vil afsløre enzymets C-terminal.

U U U
 31 AVGVTTTDFS NFKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQGNGAT 80

U
 81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSINIRNWLT NLDFGQEDCS 130

U (0)
 131 LVSGCCGVHSG FQRAWNEIIS QATAAVASAR KANPSPNVIS TGHSLGGAVA 180

181 VLAAXANLRVG GTPVDIYTYC SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

U U
 231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS GGGGDKVQYD ISDVVKVCEGA ANLGCGNGTL 280

U
 281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GFSWRRYRSA ESVDKRATMT DAELEKKLNS 330
 ↑

331 YVQMDKEYVK NNQARS

346

SEQ ID NO: 2: Udledt aminosyresekvens for *F. oxysporum*-lipase/phospholipasen.

5 Sekvensen er udledt fra DNA-sekvensen og starter i N-terminalen, som er bestemt eksperimentelt for både det native og det rekombinante enzym. De 8 Cys-reste er vist med U, mens den C-terminale Ser-rest, som er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑. Asn-resten, som findes i konsensussekvensen for N-glycosylering (NXS/T) er vist med (0), men benyttes efter al sandsynlighed ikke, da X er en Pro-rest.

10

10

Forsøgsresultater

15 Enzymet var PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch-F-9700989, OD₂₈₀ = 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

Enzymet blev udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

Enzymet blev denatureret og disulfidbindingerne blev reduceret, før thiolgrupperne blev reageret med I-[1-¹⁴C]-CH₂CONH₂.

5

Efter den radioaktive tagging af Cys-resterne blev lipasen degraderet ved anvendelse af Asp-N-proteasen.

10 De dannede peptider blev fraktioneret ved anvendelse af modfase-HPLC. De opsamlede fraktioner blev utsat for MALDI-TOF-massespektrometri og scintillationstælling. Fraktioner, som indeholdt betydelige mængder af radioaktivitet, blev valgt til formyet oprenset ved anvendelse af modfase-HPLC.

15 De påny oprensede fraktioner blev utsat for scintillationstælling, og fraktionerne, som indeholdt radioaktivitet, blev efterfølgende sekventeret.

20 Nedenfor er vist en oversigt over resultaterne. Dette skema kan se kaotisk ud på grund af de mange anførte sekvenser. Skemaet indeholder imidlertid al den sekvensdata, der er opnået fra de radioaktive fraktioner, og udgør derfor grundlaget for de dragede konklusioner. Det skal bemærkes, at alle Cys-rester er dækket ved sekventeringen, de fleste af dem mere end en gang. En anden ting at bemærke er, at de afgivende spaltninger, som ses, resulterer i et stort antal små radioaktivt mærkede peptider.

U U U

NG CPT
NNG CPTVQ
CSN
CSNNG CP
CSNNG CPTV

CNSEAAA GSX

31 AVGVIITDPS NFICPYIQHGA AAYCNSEAAA GSXITCSNNG CPTVQGNGAT 80

↓

DCS
DCS

81 IVTSPVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSYR GSINIRNWLT NLDYQQEDCS 130

U

LVSGC
LVSGCGVHSG FQRAW
131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFHVIS TGHSLGGAVA 180

181 VLAANNLRYVG GTPVDIYTYG SPRVGNQALS AFVSNQAGGE YRVTHADDV 230

U U

DVKVCEG
DVVKVCEGA ANLGCGNGCTL
DVVKVCEGA ANLGCGNGCTL

231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS CGGGDKVDYT ISOVKVCEGA ANLGCGNGCTL 280

U

DACNAG GPS
GL TDACNAG GF
281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GPSWRRYRSA ESVDKRATMT DAELEKKLNS 330
↑

331 YVQMDKEYVK NNQARS

346

5 Aminosyresekvenserne, der er opnået ved hjælp af sekventering af de radioaktivt taggede peptider, stammer fra rekombinant *F. oxysporum*-enzym. Sekvenserne er parallelstillet med aminosyresekvensen, der er udledt fra DNA-sekvensen. De 8 Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, der er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.

Forsøgskonklusion

- 10 Ud fra sekventeringen af alle de radioaktivt taggede peptider er det klart, at den C-terminale del af aminosyresekvensen, der kodes i DNA'et, processeres under ekspressionen af lipasen fra *F. oxysporum*. Peptidsekvenserne peger på Ser303 som den mest sandsynlige C-terminale rest i det modne enzym i overensstemmelse med resultatet fra MALDI-TOF-massespektrometri.
- 15 På basis af dataene kan det imidlertid ikke udelukkes, at der finder differentiel C-terminal processering sted, som fører til heterogene C-termini, for eksempel tyder ét peptid på, at Phe272 også kan findes som en C-terminal rest.

20 EKSEMPEL 10

Generel beskrivelse af assay for enzymatisk degummering af spiseolie

- 25 Udstyr til udførelse af enzymatisk degummering
- 30 Udstyret består af en 1 l-kappebeklædt stålreaktor, som er udstyret med et stållåg, en skrue (600 rpm), skærme, en temperaturføler, et indløbsrør i toppen, en tilbageløbskøler (4 °C) i toppen og et udløbsrør i bunden. Reaktorkappen er forbundet med et termostatbad. Udløbsrøret er ved hjælp af silikoneslanger forbundet til et Silverson-i linie-blandehoved, der er udstyret med en "firkantet hul- høj shearing-skærm", som styres af en Silverson L4RT-høj shearing-lab-blander (8500 rpm, flow ca. 1,1 l/minut). Blandehovedet er udstyret med en køleslange (5-10 °C) og et udløbsrør, der via silikoneslanger er forbundet med reaktorens indløbsrør. En temperaturføler er indsat i silikoneslangen umiddelbart efter blandehovedet. Den eneste forbindelse fra reaktor/blandehoved-systemet til atmosfæren er gennem tilbageløbskøleren.
- 35

Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering

Alt køle- og termostatusdyst er tændes. Herefter indføres 0,6 l (ca. 560 g) olie i reaktoren, som holdes på ca. den temperatur, der er nødvendig for det specifikke forsøg. Lab-blanderen tændes, hvorved olien starter med at cirkulere fra reaktoren til blandehovedet og tilbage til reaktoren. Systemet får mulighed for at ækvilibrere i ca. 10 minutter, i løbet af hvilket tidsrum temperaturen finindstilles. Forbehandlingsperioden starter med tilsætning af 0,6 g (2,86 mmol) citronsyremonohydrat i 27 g MilliQ-vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % (vægt/vægt; [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM), hvilket sætter $t = 0$. Til $t = 30$ minutter tilsættes en passende mængde af en 4 M NaOH-opløsning.

15	0,0 ækviv. 4 M NaOH	-> pH 3,7
	1,0 ækviv. 4 M NaOH (0,71 ml)	-> pH 4,5
	1,5 ækviv. 4 M NaOH (1,07 ml)	-> pH 5,0
	2,0 ækviv. 4 M NaOH (1,43 ml)	-> pH 5,5
	2,5 ækviv. 4 M NaOH (1,79 ml)	-> pH 6,2
	3,0 ækviv. 4 M NaOH (2,14 ml)	-> pH 8,0

20 Til $t = 35$ minutter udtages prøver til P-analyse og pH-bestemmelse. Umiddelbart herefter tilsættes den nødvendige mængde af enzym-opløsning (slut på forbehandlingsperiode). Prøver til P-analyse og pH-bestemmelse udtages til $t = 1, 2, 3, 5, 6$ timer, og herefter standses reaktionen.

25 Reaktor/blande-systemet tømmes og vaskes med 2 x 500 ml 10 % Deconex/DI-vandopløsning efterfulgt af minimum 3 x 500 ml DI-vand. Tabel 8 viser en oversigt over de forskellige tilsætninger og prøvetagninger under reaktionen.

30

TABEL 8. Plan for enzymatisk degummering

Tid	Tilsætning af	Prøvetagning	
		P-analyse	pH-bestemmelse
		X	
0	Citronsyre		
5 min.			X
30 min.		X	X
30 + δ min.	NaOH		
35 min.		X	X
35 + δ min.	Enzym		
1 time		X	X
2 timer		X	X
3,5 timer		X	X
5 timer		X	X
6 timer		X	X

Phosphor-analyse

5 Prøvetagning til P-analyse:

10 Anbring 10 ml vand-i-olie-emulsion i et glascentrifugerør. Opvarm emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter. Centrifugér ved 5000 rpm i 10 minutter. Overfør ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et 12 ml-polystyrenrør og lad det stå (til bundfældning) i 12-24 timer. Efter bundfældning udtag ca. 1-2 g fra den øverste klare fase til P-analyse.

15 P-analyse blev udført i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)":

15 Afvej 100 mg MgO (leicht, Merck nr. 5862) i en porcelænskål og opvarm med

en gasbrænder. Tilsæt 1-2 g olie og antænd med en gasbrænder til opnåelse af en sort, hård masse. Opvarm i en Vecstar-ovn ved 850 °C i 2 timer til opnåelse af hvid aske. Opløs asken i 5 ml 6 M HNO_3 og tilsæt 20 ml reagensblanding. Hensæt i 20 minutter. Mål absorbans ved 460 nm (anvend en blank (5 ml HNO_3 + 20 ml reagensblanding) til nuljustering). Beregn ved anwendung af kalibreringskurve.

5

pH-bestemmelse

10 Udtag 2 ml vand-i-olie-emulsion og bland med 2 ml MilliQ-vand. Efter faseseparering afpipetter det øverste olielag. Mål pH i vandfase med pH-elektrode Orion. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af formlen:

15
$$\text{pH}_{\text{real}} = \text{pH}_{\text{målt}} - 0,38.$$

En kalibreringskurve opnåedes ved hjælp af oplosning af 0,6 g citronsyremonohydrat i 27 g DI-vand, pH i denne oplosning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{real}). 100 μl blev blandet med 2 ml MilliQ-vand, og pH i denne oplosning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion ($\text{pH}_{\text{målt}}$). pH i citronsyre-oplosningen blev ændret gradvist ved hjælp af tilsetning af NaOH-oplosning, og for hver justering blev fortyndning og pH-målinger udført som beskrevet ovenfor.

20

25

EKSEMPEL 11

Optimale degummeringsbetingelser for Lecitase™

Alle forsøg vedrørende degumming af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

30

Olie:

Vanddegummet rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00730/B01200, 9 kg, P-indhold 186 ppm (0,47 % phosphatid).

35

Olien er ikke et kommersielt tilgængeligt produkt, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

Enzym:

Lecitase™ 10L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

- 5 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optiméringsforsøg med Lecitase™ er vist i tabel 9. Standardbetingelser er: enzymdosis 535 U/kg olie (1,1 mg/kg olie), 60 °C, 2,0 ækviv. NaOH (pH 5,5). Enzymdosen er varieret fra 268-1070 U/kg olie, temperaturen er varieret fra 40-70 °C, og NaOH-tilsætning er varieret fra 1,0-3,0 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 9.
- 10

TABEL 9. Specifikke betingelser for Lecitase™-optimering

For- søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH- niveau	Enzymdosis (U/kg olie)
10	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	0 (blind)
21	Colzro 1208	60 °C	0,0	3,7	0 (blind)
8	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
9	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
11	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	268
12	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	1070
15	Colzro 1200	70 °C	2,0	5,5	535
17	Colzro 1200	50 °C	2,0	5,5	535
18	Colzro 1200	40 °C	2,0	5,5	535
19	Colzro 1200	60 °C	1,0	4,5	535
40	Colzro 1209	60 °C	1,5	5,0	535
44	Colzro 1429	60 °C	2,5	7,0	535
20	Colzro 1200	60 °C	3,0	8,0	535

15 pH fra t = 35 minutter - 6 timer. Indenfor dette tidsrum var alle pH-bestemmelser inden for et smalt interval. Dette illustreres yderligere i eksempel 13 nedenfor.

En oversigt over de separate optimeringsundersøgelser er vist i tabel 10.

Resultaterne i tabel 10 viser:

- 5 i) at det af dosis/reaktions-undersøgelsen fremgår, at optimal enzymdosis (ved 60 °C og 2,0 ækviv. NaOH) er ca. 535 U/kg olie. Halv dosis øger degummeringstiden fra ca. 3,5 timer til 6 timer, og dobbelt dosis frembringer ingen ændring i degummeringsydeevnen. Enzymblindprøve-resultaterne er indsat til sammenligning,
- 10 ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) med dårlig ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5) og 3,0 ækviv. (pH ca. 8),
- 15 iii) at optimal temperatur er ca. 60 °C, da 70 °C ikke bringer P-niveauet helt ned, 50 °C øger degummeringstiden fra ca. 3,5 til 6 timer, og 40 °C giver dårlig ydeevne.

TABEL 10: Resultater vedrørende optimering af Lecitase™-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
10	160	140	116	118	108	109	105	109
21	178	149	-	143	142	143	147	154
8	164	139	117	85	30	-	2	3
9	164	136	109	79	14	4	3	4
11	183	149	123	104	78	35	10	7
12	165	131	117	71	13	3	4	3
15	170	139	127	83	23	10	11	9
17	162	134	127	95	56	15	11	5
18	176	151	136	100	66	28	24	28
19	171	139	147	142	142	118	91	80
40	184	149	157	126	109	73	40	30
44	226	202	197	148	99	66	40	34
20	165	136	111	102	90	81	73	72

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase ved angivne tidspunkter i timer.

5 EKSEMPEL 12

Optimale degummeringsbetingelser for en *Fusarium oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

- 10 Alle forsøg med enzymatisk degumming af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00730/B01208, P-indhold ca. 200 ppm

Batch C00730/B01209, P-indhold ca. 200 ppm

5 Batch C00730/B01429, P-indhold 227 ppm

Batch C00730/B01430, P-indhold 252 ppm

Olierne er ikke kommersielt tilgængelige, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

10 Enzym:

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700123, $OD_{280} = 1,48$, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.

15 Enzymet var udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

20 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med PL fra *Fusarium oxysporum* er vist i tabel 11. Standardbetingelser er: enzymdosis 1,6 mg/kg olie, 40 °C, 1,5 ækviv. NaOH (pH ca. 5,0). Enzymdosis er varieret fra 0,2-1,6 mg/kg olie, temperaturen er varieret fra 30-50 °C, og NaOH-tilsætningen er varieret fra 1,0-2,5 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 11.

TABEL 11. Specifikke betingelser til optimering af PL fra *Fusarium oxysporum*

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (mg/kg olie)
31	Colzro 1208	40 °C	1,5	5,0	1,6
53	Colzro 1429	40 °C	1,5	5,3	1,6
33	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,8
35	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,4
36	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,2
38	Colzro 1209	50 °C	1,5	5,0	1,6
64	Colzro 1430	45 °C	1,5	5,0	1,6
39	Colzro 1209	30 °C	1,5	5,0	1,6
32	Colzro 1209	40 °C	1,0	3,5	1,6
13	Colzro 1200	40 °C	1,0	4,5	1,6
45	Colzro 1429	40 °C	1,25	5,0	1,6
46	Colzro 1429	40 °C	1,75	5,5	1,6
34	Colzro 1209	40 °C	2,0	5,5	1,6
37	Colzro 1209	40 °C	2,5	6,2	1,6

Forsøgsresultaterne er vist i tabel 12 nedenfor. pH-afgivelserne i tidsvinduet 35 minutter - 6 timer faldt alle inden for de forventede intervaller med kun mindre 5 uregelmæssigheder.

Sammenfattet viser resultaterne i tabel 12 nedenfor:

- 10 i) at det af dosis/reaktions-testene fremgår, at den optimale enzymdosis (ved 40 °C og 1,5 ækviv. NaOH) er ca. 0,8 mg/kg olie,
- ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 1,5 ækviv. (pH ca. 5,0) med ingen ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5), med begrænset ydeevne ved 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) og 2,5 ækviv. (pH ca. 6,2), og

iii) at den optimale temperatur er ca. 45 °C, og 50 °C giver begrænset
ydeevne.

5

**TABEL 12: Resultater vedrørende optimering af *Fusarium oxysporum*-
degummeringsbetingelser**

For- søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
31	169	130	136	15	8	7	8	7
53	232	203	208	32	10	7	7	4
33	188	156	160	27	7	6	6	8
35	181	153	153	78	5	5	4	6
36	187	162	157	117	61	32	20	15
38	187	149	146	84	83	68	58	55
64	252	192	201	10	4	4	4	4
39	184	163	158	36	7	7	9	9
32	167	137	165	152	146	151	148	146
13	170	140	141	140	133	126	130	131
45	221	189	195	161	118	99	92	95
46	225	187	163	93	4	7	6	15
34	189	174	165	61	27	25	26	19
37	205	168	157	88	22	23	20	21

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase på angivne tidspunkter i timer.

EKSEMPEL 13Visning af standard-pH-afvigelser under en enzymatisk degummeringsproces

- 5 Tabel 13 nedenfor viser et gennemsnitseksempel for pH-afvigelser under den enzymatiske degummeringsproces, der udføres som beskrevet i eksempel 10.

Forsøgene udføres med Lecitase™. Se eksempel 11 for yderligere detaljer.

10 TABEL 13: pH-værdier fra $t = 35$ minutter - 6 timer

Tid (timer)	pH Forsøg 8 (2,0 ækv)	pH Forsøg 15 (2,0 ækv)	pH Forsøg 19 (1,0 ækv)	pH Forsøg 20 (3,0 ækv)
0,58	4,97	5,80	4,45	7,38
1,0	5,82	5,75	4,46	7,63
2,0	5,50	5,44	4,57	8,13
3,5	5,35	5,34	-	8,37
5,0	5,25	5,47	4,47	8,21
6,0	5,01	5,26	4,43	8,05

Hvis ikke andet er angivet i eksemplerne på forsøg med enzymatisk degumming, der er beskrevet heri, var standard-pH-afvigelserne i nævnte forsøg som vist i tabel 13 ovenfor.

15

EKSEMPEL 14Sammenligning af enzymatisk degummeringskapacitet hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen

20

I figur 2 er vist resultaterne fra PL'erne under deres respektive optimale betingelser, som bestemt i eksempel 11 og 12 ovenfor.

Forsøgsbetingelser, der er vist i figur 2:

25

Lecitase™: 60 °C, pH 5,5 (2,0 ækviv. NaOH) og 1 mg enzym/kg olie (ca. 535 U) (forsøg nr. 9).

5 *Fusarium oxysporum* PL: 40 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 0,8 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 33).

Fusarium oxysporum PL: 45 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 1,6 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 64).

10 Tilsyneladende giver PL fra *Fusarium oxysporum* en meget hurtig degummeringseffekt sammenlignet med Lecitase™.

PL fra *Fusarium* ifølge opfindelsen giver en næsten total degumming efter ca. 25 minutters kontakt mellem enzym og olie.

15 **EKSEMPEL 15**

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i forskellige typer af spiseolier

20 **Olier:**
Rårapsfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.
Denne batch indeholder faste rester.

25 Rårapsfrøolie fra Scanola (Danmark).
Batch C00745/B01593, P-indhold 315 ppm.

30 **Filtreret rårapsfrøolie.**
Batch C00745/B01146 filtreret, P-indhold 231 ppm.
Denne olie er Batch C00745/B01146 ovenfor (609 ppm), der er filtreret gennem et 100 µm Johnson-filter.

35 Rårapsfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Rapsfrøolie fra Lurgi, Tyskland.

Batch C00932/B1381, P-indhold 148 ppm.

Råsojabønneolie fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00744/B01145, P-indhold 593 ppm.

5

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor, blev udført ved hjælp af forbehandling af olierne ved hjælp af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

I korte træk omfatter forbehandlingsprocessen,

15

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

20

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

25

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

30

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer,

efter bundfældning udtag 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien. ppm-værdien blev bestemt som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Ifølge denne proces var mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som var til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor:

35

rårapsfrøolien nr. 1146 fra AOM, der indeholder fast partikelholdigt materiale, som til dels er ansvarligt for det høje P-niveau (609 ppm), filtrering gennem et 100 µm Johnson-filter gav en klar olie med et P-indhold på 231 ppm.

- Forbehandling af råolien og af den filtrerede olie gav et P-niveau på 140 ppm, som er et mål for de ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i olien;
- 5 phospholipid-indholdet i en rårapsfrøolie fra Scanola blev reduceret fra 315 ppm til ca. 30 ppm ved hjælp af forbehandling,
- 10 phospholipid-indholdet i en rapsfrøolie, som var opnået fra Lurgi (sandsynligvis vilkårlig blanding af råolie og totalt raffineret olie), blev reduceret til 60 ppm ved hjælp af forbehandlingsprocessen,
- 15 forbehandling rårapsfrøolie nr. 1710 fra AOM reducerede P-indholdet fra 459 til 200-250 ppm,
- 20 ved råsojabønneolie nr. 1145 fra AOM reducerede forbehandling P-niveauet fra 593 til 10 ppm. Denne sojabønneolie er et eksempel på en olie, der kan degummeres ved hjælp af vanddegummering/citrat-behandling alene. Enzymtilsætning til denne råsojabønneolie efter forbehandling reducerede ikke P-indholdet yderligere.
- 25 Disse data viser, at phospholipid-sammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) i rårapsfrøolie varierer meget fra én batch til en anden, og følgeligt vil niveauet af resterende phospholipid i vanddegummeret rapsfrøolie variere over et bredt interval (30 ppm (Scanola) til 200-250 ppm (AOM)).
- 30 Til enzymatisk degummering afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbart phospholipid, som er til stede efter degummering eller forbehandling.
- 35 Endvidere gælder det, at jo højere mængde af ikke-hydrerbart phospholipid, der er til stede i olien, jo mere anvendelig er den enzymatiske degummeringsmetode.
- Dette illustreres også i eksempel 16 nedenfor, hvor den foreliggende opfindelse viser enzymatisk degummering af rårapsfrøolie nr. 1146, som har et ikke-hydrerbart phospholipid-niveau på ca. 140 ppm.

EKSEMPEL 16Degummering af rårapsfrø-spiseolie (I)

5 Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

Rårapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

10 Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.
Denne batch indeholder faste rester.

Enzym:

Lecitase™ 10 L.

15 Batch L646-F02 (10190 U/ml), aestimeret koncentration 20 mg/ml.

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

20 Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, aestimeret koncentration 0,9 mg/ml.
Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A (reference)

25 0,6 l (580 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes 30 µl (300 U) Lecitase™ 10L (som er leveret af Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i tabel 14.

30

TABEL 14. Resultater fra degrumering af rårapsfrøolie med Lecitase™

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,8
0,58	146	5,6
1,0	127	5,6
2,0	88	5,7
3,5	61	5,7
5,0	44	5,6
6,0	34	5,8

Forsøg B

- 5 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,4. Til $t = 35$ minutter tilsættes 1 ml (0,9 mg) af en oprenset oplosning (eksempel 2) af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i
10 tabel 15.

TABEL 15. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,9
0,58	149	5,4
1,0	91	5,3
2,0	13	5,4
3,5	11	5,3
5,0	13	5,4
6,0	10	5,2

EKSEMPEL 17

5

Degummering af rårapsfrø-spiseolie (II)

Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

Olie:

Rårapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00745/B01710, P-indhold 459 ppm.

15

Enzym:

Lecitase™ 10 L.
Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

20

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700470, $OD_{280} = 0,8$, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,45 mg/ml.

Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A

5 0,6 l (580 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (for eksempel 50 μ l (ca. 500 U) til 1 mg enzym/kg olie) af Lecitase 10L (som er opnået fra Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 16.

10

TABEL 16. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med Lecitase

Tid (timer)	1 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	2 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	3 mg Lecitase /kg olie P(ppm)
0	459	459	459
0,50	251	235	248
0,58	202	194	202
1,0	181	186	183
2,0	165	156	107
3,5	111	66	11
5,0	52	12	12
6,0	20	5	9

Forsøg B

15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,0. Til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1,6 mg enzym/kg olie og 3,2 mg enzym/kg olie) af en oprenset oplosning af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 17.

20

TABEL 17. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	1,6 mg <i>Fusarium</i> / kg olie, P(ppm)	3,2 mg <i>Fusarium</i> / kg olie, P(ppm)
0	459	459
0,50	236	208
0,58	193	173
1,0	109	96
2,0	9	7
3,5	9	8
5,0	9	9
6,0	9	9

Sammenfattet viser resultaterne:

5

Lecitase, 60 °C, pH 5,5

Enzymdosen blev varieret fra 1,0 til 3,0 mg/kg olie. Resultaterne er vist i tabel 16 ovenfor. Ved en enzymdosis på 1,0 mg/kg olie var degummering langsom og gav ca. 20 ppm efter 6 timer. Med de høje enzymdoser blev degummerings-ydeevnen forbedret til opnåelse af et phosphorindhold på 10 ppm efter ca. 3,5 timer med 3,0 mg enzym/kg olie.

10

Det formodes, at ydeevnen vil forbedres yderligere, hvis der anvendes højere enzymdoser.

15

F. oxysporum PL, 45 °C, pH 5,0

Enzymdoserne 1,6 og 3,2 mg/kg olie blev testet, og ydeevnen viste sig at være lige god (tabel 17 ovenfor). Med 1,6 mg enzym/kg olie - eller muligvis mindre - observeredes fortræffelig degummering, som gav 9 ppm P efter ca. 2 timer. Det forventes, at det er muligt at anvende endnu lavere mængder af *F. oxysporum*-phospholipase (for eksempel 0,9 mg/kg olie) og stadig opnå god degummerings-ydeevne.

EKSEMPEL 18Degumming af vanddegummeret spiseolie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, der er opnået fra *Fusarium culmorum*

5

Der blev udført et forsøg ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degumming" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

10 Vanddegummeret rapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00730/B01700, P-indhold 231 ppm.

Enzym:

15 Et fermenteringsmedium fra *Fusarium culmorum*.
En *Fusarium culmorum*-stamme blev dyrket og centrifugeret, og supernatanten blev oprenset som beskrevet nedenfor.

20 Podekulturer af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 (deponeringsdato den 25. oktober 1994) blev frembragt i 500 ml-rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende sammensætning:

Majsudblødningsvæske (tørret)	12 g/l
Glucose	24 g/l

25 Til hver kolbe tilstsættes 0,5 g CaCO₃ og 0,5 mlolie. pH justeres til 5,5 før autoklavering.

Efter 3 dage ved 26 °C og 250 rpm blev 5 ml af hver af podekulturene podet i rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende medium:

30

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Peptidase, Sheffield Products	4 g/l
Gærekstrakt, Difco 0127	3 g/l
Kødestrakt, Difco 0126	1,5 g/l
35 Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olivenolie, Sigma	10 g/l

pH justeres til 7,3-7,4 før autoklavering.

5 Dyrkning fandt sted i 9 dage ved 26 °C og 250 rpm. Medierne blev centrifugeret og filtreret (0,45 µm) og supernatanterne opsamlet og anvendt til degummeringsforsøgene, der er vist nedenfor.

Æstimeret aktivitet 200 PHLU/ml.

10 Forsøg: Enzymatisk degummering af en vanddegummeret olie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, som er opnået fra *Fusarium culmorum*

15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,5. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1070 PHLU/kg olie) af en oprenset oplosning af phospholipase fra *F. culmorum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 18.

20 TABEL 18. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. culmorum*

Tid (timer)	1070 U <i>F. culmorum</i> /kg olie P(ppm)
0	254
0,50	-
0,58	213
1,0	137
2,0	61
3,5	9
5,0	8
6,0	7

EKSEMPEL 19Enzymatisk degummering af råolie ved anvendelse af Degomma VOD5 Olie:

Rårapsfrøolie C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Enzym:10 En kommercial tilgængelig phospholipase Degomma VOD (Röhm, Tyskland),
æstimeret koncentration 10 mg/ml.15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 50 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 0,714 ml (2,86 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 4,5. til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 3,6 mg/kg olie eller 7,1 mg/kg olie) af en oprenset oplosning af Degomma VOD-phospholipase. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 19.

TABEL 19

Tid	3,6 mg/kg olie	7,1 mg/kg olie
0	276	273
0,50	216	253
0,58	210	246
1,0	127	94
2,0	45	16
3,5	15	7
5,0	15	10
6,0	14	10

20

Dette eksempel viser, at Degomma VOD er i stand til at degummere en spiseolie. For at opnå en tilfredsstillende degummering af nævnte olie kræves imidlertid relativt høje doser af Degomma VOD sammenlignet med *Fusarium*-phospholipasen ifølge opfindelsen. Se for eksempel eksemplerne 16 og 17 til

sammenligning.

EKSEMPEL 20

- 5 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et brødforbedrende middel

Materialer og metoder

- 10 Fremstilling af brød

Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

15	<u>Grundopskrift</u>	
	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
	Gær	4 %
	Salt	1,5 %
20	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

25	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
30	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
	Hævning (32 °C, 82 % RH)	
	Kuvertbrød:	45 min.
35	Formbrød:	55 min.
	Bagning (230 °C)	
	Kuvertbrød:	22 min.

Formbrød: 35 min.

Vurdering af dej og bagte produkter

- 5 Egenskaberne for dejen og de bagte produkter blev bestemt som følger:

10 Specifikt volumen-ideks: Volumen af et brød eller et kuvertbrød måles ved hjælp af den traditionelle rapsfrø-fortrængningsmetode. Det specifikke volumen beregnes som volumen ml pr. g brød. Det specifikke volumen af kontrollen (uden enzym) defineres som 100. Det relative specifikke volumen-indeks beregnes som:

$$\text{Specifikt volumen-indeks} = \frac{\text{brødets specifikke volumen}}{\text{specifik volumen af kontrolbrød}} \times 100$$

15

Dejens klæbetilbøjelighed vurderes manuelt i overensstemmelse med følgende skala:

	Kuvertbrødform:	meget flad	1
20	flad	2	
	normal	3	
	god/rund	4	
	meget god	5	
	far rund	6	

25

30

35

RESULTATER

TABEL 20

Enzym/ additiv								
A)					1	1	1	1
B)		500	1500	3000		500	1500	3000
C)	100	110	106	93	99	111	116	108
D)	100	106	99	94	102	107	109	103
E)	3	4	4	3	3	4	5	4,5

- 5 A) Lecimulthin 100 (g/kg mel)
 B) F.o.-phospholipase (LU/kg mel)
 C) Specifikt volumen-indeks (kuvertbrød)
 D) Specifikt volumen-indeks (formbrød)
 E) Kuvertbrødfork (score)
- 10 Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Resultaterne viser en klar volumenforøgende effekt af *Fusarium oxysporum*-phospholipase på både kuvertbrød og formbrød ved opskriften, som ikke indeholder lecithin. Hvis lecithin indbefattes i opskriften, opnås endnu bedre volumeneffekter, selvom lecithin ikke selv bidrager til volumen. En statistisk analyse (ANOVA, $\alpha = 0,05$), som blev udført i Statgraphics Plus, release 3.0, viser en signifikant positiv synergisk effekt mellem phospholipasen og lecithinen.

20 Både med og uden lecithin i opskriften opnås en betydeligt forbedret form af kuvertbrød med *F. oxysporum*-phospholipasen. I dette eksempel opnåedes den bedste kuvertbrødfork ved en blanding af lecithin og phospholipase (1500 LU/kg mel).

EKSEMPEL 21

25 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et anti-friskhedstabende middel

Materialer og metoderFremstilling af brød

5 Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

Grundopskrift

	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
10	Gær	5 %
	Salt	1,5 %
	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
20	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
25	Hævning (32 °C, 82 % RH)	55 min.
	Bagning (230 °C)	35 min.

30 I dette eksempel blev brødene anbragt i forme med låg for at undgå forskelle i de specifikke volumener før strukturanalyse. Efter nedkøling blev brødene opbevaret ved stuetemperatur, pakket i plastikposer.

Vurdering af bagte produkter

Vurdering af friskhedstab og struktur kan udføres ifølge AACC-metoden 74-09. En vurdering af brødkrummers blødhed som indikator for brøds friskhedstab blev udført 0, 1, 3 og 7 dage efter bagning i overensstemmelse med følgende

5 procedure:

En skive brød blev komprimeret ved konstant hastighed i en strukturanalyse (TA TX-2), og styrken af kompressionen blev målt i g. Krummens fasthed måles som styrken ved 25 % kompression. En brødkrummes fasthed stiger

10 efterhånden som brødet mister friskhed.

Resultater

Resultaterne fra fasthedsmålinger som funktion af opbevaringsdage er vist i

15 tabel 21. Lecimulthin blev tilsat i en koncentration på 1 g/kg mel, og *Fusarium oxysporum*-phospholipasen blev tilsat i en dosis på 500 U/kg mel. Hvert resultat i tabellen er gennemsnitsværdien for 6 målinger (2 brød, 3 målinger på hver).

20 TABEL 21

Enzym/additiv	Fasthed Dag 0	Fasthed Dag 1	Fasthed Dag 3	Fasthed Dag 7
Kontrol	223	350	631	1061
Lecimulthin 100°	225	261	532	1010
Phospholipase	201	303	573	1257
Lecimulthin 100° + phospholipase	169	304	468	834

° Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Som det fremgår af tabel 21, var brødene, der var behandlet med phospholipase, lidt blødere end kontrollen op til 3 dages opbevaring. I

25 kombination med lecithin kunne der opnås en betydelig anti-friskhedstabende effekt under hele opbevaringen (som ikke er opnåelig med lecithin eller phospholipase alene).

SEKVENSLISTE

5 SEQ ID NO: 1 viser en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som omfatter en DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 1

- 10 (i) SEKVENSEGENSKABER:
 (A) LÆNGDE: 1170 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHED: enkeltstrenget
 (D) TOPOLOGI: lineær
- 15 (ii) MOLEKYLETYPE: cDNA
- (vi) NATURLIG OPRINDELSE:
 (A) ORGANISME: *Fusarium oxysporum*
 (B) STAMME: DSM 2672
- 20 (ix) EGENSKAB:
 (A) NAVN/KODE: CDS
 (B) PLACERING: 23..1063
- 25 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1

TTGGAGAGATA TTCCCTTGTCGA CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG GCC ATC	52
Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile	
1 5 10	
ACC CTC CGG GTA CCC ACT CCT GCA CCT CTC GAC GAC TAC GTC AAC TCT	100
Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser	
15 20 25	
CTT GAC CAG CCA GCT CTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC ACC AAC TTC	148
Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe	
30 35 40	
AAG TTC TAC ATC CAA CAC CCC GCA CCT TAC TGC AAC TCT GAA GCC	196
Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala	

30

35

45	50	55	
GCA GCT CGT TCC AAC ATC ACC TGC TCC AAC AAT CCC TGT CCA ACC GTT			244
Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val			
60	65	70	
CAC CGC AAC CGA CGG ACC ATC GTG ACA TCT TTC GTT CCC TCC AAG ACA			292
Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr			
75	80	85	90
CGT ATC CGT CGC TAC GTC CGG ACA GAC TCT GCC CGA AAG GAA ATC GTC			340
Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val			
95	100	105	
CTC TCC TTC CGC CGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TCG CTT ACC AAC CTC			388
Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu			
110	115	120	
GAC TTC CGC CGA GAA GAC TGC AGT CTC GTC TCT CGA TGC CGT GTC CAC			436
Asp Phe Gly Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His			
125	130	135	
TCT CGC TTC CGC CGA CGC TGG AAT GAA ATC TGG TCT CAA CGA ACC GCT			484
Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala			
140	145	150	
GCT GTT GCC TCC CGC CGC AAG CGC AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT			532
Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser			
155	160	165	170
ACA GGC CAC TCC CTT CGA GGT CGC GTC CGC CTT CCT CGC CGA AAC			580
Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Asn			
175	180	185	
TTG AGA GTC GGT CGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GGC TCT CCC			628
Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro			
190	195	200	
CGT GTC CGA AAC CGG CGG CTC TCA CGC TTC GTC TCA AAC CGG CCT CGT			676
Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly			
205	210	215	
GGA GAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT			724
Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro			
220	225	230	

CCT CTG ATC TTC CGA TAC AGG CAC ACA ACT CCT GAG TTC TCC TCG TCC Pro Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser 235 240 245 250	772
GCC CGT CGA CGC GAC AAC GTT GAC TAC ACC ATC AGC GAT GTC AAG GTC Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val 255 260 265	820
TGT GAC CGT CCT GCC AAC CTT CGA TCC AAC CGT CGG ACT CCT CGT TGC Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu 270 275 280	868
CAT ATT CCT CCT CAT CTG CAT TAC TTC CAG CGG ACT GAC CCC TGT AAC Asp Ile Ala Ala His Leu Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn 285 290 295	916
CCT CGT CGC TTC TCT TGG CGA CGA TAC AGA AGC GCC GAG AGC GTC GAC Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp 300 305 310	964
AAG AGG CCC ACC ATC ACT GAT GCC GAG CTT GAG AAG AAG CTG AAC TCT Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser 315 320 325 330	1012
TAT GTC CAG ATG GAT AAG GAG TAT GTG AAG AAT AAC CGG CCC CGC TCT Tyr Val Glu Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser 335 340 345	1060
TAA CGAGGGTAGC ACCTTTGATG CGAAATGACA TGATTCATGA ACCAAACCAT	1113
ACTACATATG ATCCAAATAG GATATAAAA CATATTCAT TCACTAGCTT TACACAA 1170	

5 SEQ ID NO: 2 viser aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 2

- | | |
|----|---------------------------------------|
| 10 | (i) SEKVENSEGENSKABER: |
| | (A) LÆNGDE: 346 aminosyrer |
| | (B) TYPE: aminosyre |
| | (D) TOPOLOGI: lineær |
| 15 | (ii) MOLEKYLETYPE: protein |
| | (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2 |

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
1 5 10 15

Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
20 25 30

Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
50 55 60

Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
65 70 75 80

Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
100 105 110

Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
115 120 125

Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
130 135 140

Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
145 150 155 160

Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly

165

170

175

Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr
 180 185 190

Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln
 195 200 205

Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr
 210 215 220

His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr
 225 230 235 240

Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Asp Lys
 245 250 255

Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn
 260 265 270

Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu
 275 280 285

His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp
 290 295 300

Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr
 305 310 315 320

Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys
 325 330 335

Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser
 340 345

Patentkrav:

1. Polypeptid, som fremviser phospholipase A-aktivitet, der er valgt fra gruppen, som består af:

5

(a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

10

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

15

(d) et polypeptid, der er mindst 70 % homologt med polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c).

2. Polypeptid ifølge krav 1, som er en phospholipase A1.

20

3. Polynukleotid, som omfatter en sekvens, der er valgt fra gruppen, som består af:

25

(a) den phospholipase A-kodende sekvens, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

(b) nukleotiderne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,

(c) nukleotiderne 113-1063 i SEQ ID NO: 1,

30

(d) nukleotiderne 113-931 i SEQ ID NO: 1,

(e) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

35

(f) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

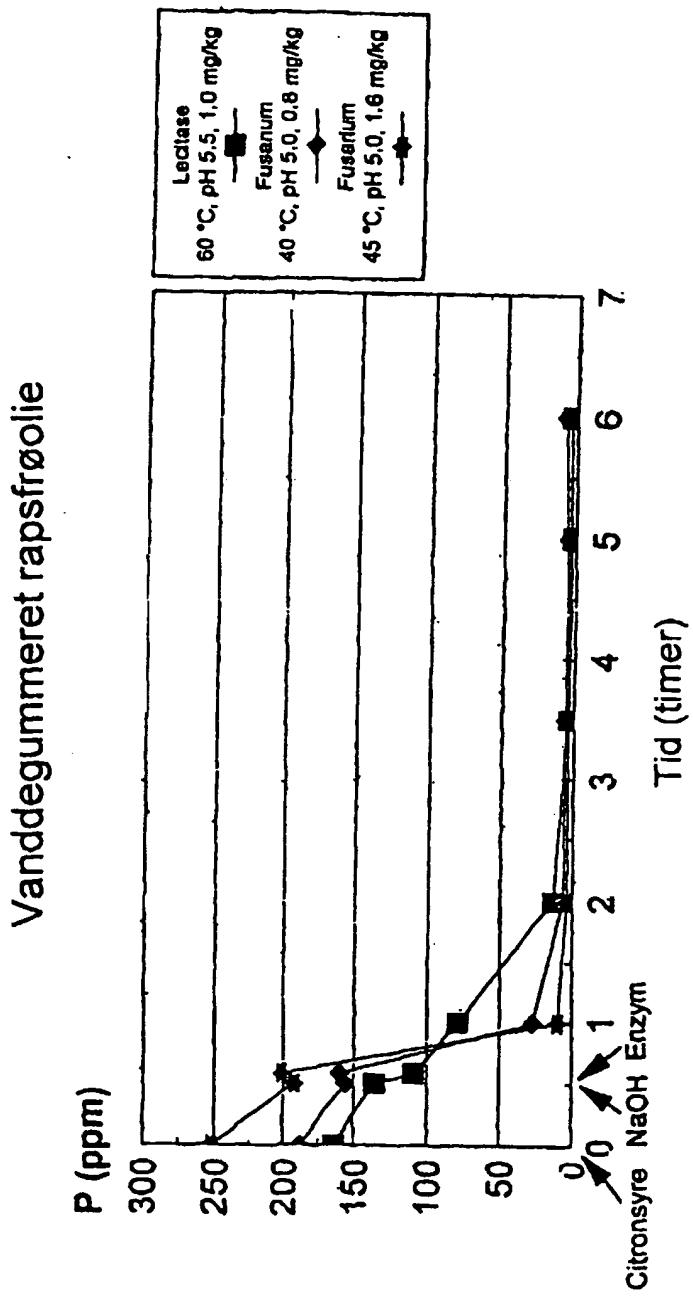
(g) et polynukleotid, der er mindst 70 % homologt med et hvilket som helst

af ovennævnte polynukleotider, hvor polynukleotidet koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase A-aktivitet.

4. Polynukleotid ifølge krav 3, der koder for et phospholipase A1-polypeptid.
- 5
5. Vektor, som omfatter polynukleotidet ifølge krav 3 eller 4.
6. Værtscelle, som omfatter vektoren ifølge krav 5.
- 10 7. Værtscelle ifølge krav 6, som er en eukaryotcelle, især en svampecelle, såsom en trådsvampecelle, for eksempel *Aspergillus* eller *Fusarium*.
8. Fremgangsmåde til frembringelse af en phospholipase A, som omfatter:
 - 15 (a) dyrkning af værtscellen ifølge krav 6 eller 7 under betingelser, der er passende til ekspresion af phospholipasen og
 - (b) indvinding af phospholipasen.
- 20 9. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces, som omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtacylgrupper.
- 25 10. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, der har et phosphorindhold fra 50-250 ppm, som omfatter behandling af olien med polypeptidet til hydrolysering af en stor del af phospholipidet og separering af en vandfase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid, fra olien.
- 30 11. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til frembringelse af et bagt produkt, som omfatter tilsætning af polypeptidet til en dej og bagning af dejen til frembringelse af det bagte produkt.

F.oxytorm	1	[ML]I[PLL][S][T]LA[VASPVA[L[DYYNSLEERA	31
F.heterotorm	1	[MM]V[SSL][S][AFTAGPPSV[DENTAVLEHRA	33
F.oxytorm	32	[GVTTT][FSN][KFY][QHGAAYCNS[SEAAAGSKI	64
F.heterotorm	34	[VTVT][QDLSN][F]Y[LOHADAYCNCNTAVGKPV	66
F.oxytorm	65	[TGS][NNGCPTVQGNGAT][VTS][FVGSKTGIGGYVA	97
F.heterotorm	67	[HCSAGNCPDIEKDA][VYGS][VUGTKIGIGAYVA	99
F.oxytorm	98	[TD][S][ARKEIVVSFRGS][N][IRNWLTNL][DFGQEDCS	130
F.heterotorm	100	[TD][N][ARKEIVVSFRGS][N][VRNW][TN][N][FGK][TCD	132
F.oxytorm	131	[LVSGCGVH][SIGFORAWNE][ISSQATAAVASA[RKAN	163
F.heterotorm	133	[LVAGGGVHTGFLDAWEEVAANVKAAVSAAKTA[N	165
F.oxytorm	164	[PS][FN][V][S][T][GHS][LGGAAVAVLAAAN][RVGGTPYD	186
F.heterotorm	166	[PTEK][FV][T][GHS][LGGAAVATAAYLRKDGF][PFDL	188
F.oxytorm	197	[TYGGSPRVGN][AQLSAFVSN][QAGGEYRVTHADDP	220
F.heterotorm	199	[TYGGSPRVGN][FFANFVTDQ][TGAEEYRVTHADDP	221
F.oxytorm	230	[VPR][PPI][FGYRHT][T][PEFWL][SGGGGDKVDTIS	262
F.heterotorm	232	[VPR][PPI][VFGYRHT][SPEYWLN][GGPLDK-DYTIVT	263
F.oxytorm	263	[DVKVCEGAANL][GCNGGT][GLD][AAHLHYFQATD	295
F.heterotorm	264	[EIKVCEGIANV][MCNGGT][GLD][AAHLHYFQATD	296
F.oxytorm	298	[ACNAGGF][SW][ARRYRSAESVDKRA[T][DAELEKKL	320
F.heterotorm	297	[TCAPIAI][PKB][...][...][...][...][DMSSDEELEKKL	319
F.oxytorm	329	[NSYVQMDKEVYVNNQARS	344
F.heterotorm	319	[TQYS][EMDQE][FYKQMI][...]	333

Fig. 1

Fig. 2 Oliedegummering - *Fusarium* PL vs. Lecitase



TELEFAX 1 SIDE
HASTER

Patent- og Varemærkestyrelsen
Helgeshøj Allé 81
2630 Tåstrup

19 December 2002

Att.: Kassen

Deres ref:
Vor ref: 4798.202-EP

DK/EP oversættelse vedrørende EP patent 0869167

Trykningsgebyr

Vi skal hermed anmode om at trykningsgebyret for ovennævnte patent trækkes på kontonr. PDK
1.

N B

Vi beder Dem venligst bekræfte modtagelsen af dette brev pr. fax. På forhånd tak.

Med venlig hilsen

Novozymes A/S

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Sten Lottrup Knudsen".

Sten Lottrup Knudsen

Patents

Novozymes A/S
Patents

Krogshøjvej 36
DK-2880 Bagsværd
Denmark

Telephone:
+45 8824 9999
Telefax:
+45 4442 6080

Internet:
www.novozymes.com

CVR number:
10 00 71 27

NZAS-0007559

19. DEC 2002

mf

DK/EP

Please return this copy



Patent- og
Varemærkestyrelsen
Erhvervsministeriet

Helgeshøj Allé 81
2630 Taastrup

Tlf. 43 50 80 00
Fax 43 50 80 01
Postgiro 8 889 923
E-post pvs@dkpto.dk
www.dkpto.dk

oversættelse vedrørende EP patentansøgning / EP patent

Reference	Country
Trykningsgebyr: Agent 19. DEC 2002	Ansøgers fuldmægtigs referencenr.:
7.390,- <i>SLK</i>	4798,202-EP/DK
Action	Term

Ansøger (fulde navn og adresse):

Flere ansøgere på bagsiden.

NOVOZYMES A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

SLK 19 DEC 2002

Fuldmægtig (navn og adresse):

Dansk benævnelse:

REDUKTION AF PHOSPHOR-INDHOLDENDE BESTANDDELE I
SPISEOLIER; SOM OMFATTER EN STOR MENGDE IKKE-HYDRERBART
PHOSPHOR, VED ANVENDELSE AF EN PHOSPHOLIPASE, EN PHOS-
PHOLIPASE FRA EN TRÅDSVAMP, DER HAR EN PHOSPHOLIPASE
A OG/ELLER B AKTIVITET.

Bilagsfortegnelse:

- Dansk oversættelse af krav (T1) i 2 ekspl.
- Rettet dansk oversættelse af krav (T2) i 2 ekspl.
- Dansk oversættelse af patent (T3)
- Dansk oversættelse af ændret patent (T4)
- Rettet dansk oversættelse af patent (T5)
- Tegning
- Fuldmagt

Dato og underskrift: Bagsværd, 17. december 2002
Novozymes A/S

Sten Lottrup Knudsen

EP ansøgningsnummer: 97 610 056.0

EP publiceringsnummer: 0869167

EP patentnummer: 0869167

10.1-mar00/s

NZAS-0007560

DK/EP

oversættelse vedrørende EP patentansøgning / EP patent



Patent- og
Varemærkestyrelsen
Erhvervsministeriet

Helgeshøj Allé 81
2630 Taastrup

Tlf. 43 50 80 00
Fax 43 50 80 01
Postgiro 8 889 923
E-post pvs@dkpto.dk
www.dkpto.dk

Trykningsgebyr:

7.390,-

Ansøgers/fuldmægtigs referencenr.:

4798, 202-EP/DK

Ansøger (fulde navn og adresse):

NOVOZYMES A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

Flere ansøgere på bagsiden.

Fuldmægtig (navn og adresse):

Dansk benævnelse:

REDUKTION AF PHOSPHOR-INDHOLDENDE BESTANDDELE I
SPISEOLIER; SOM OMFATTER EN STOR MENGDE IKKE-HYDRERBART
PHOSPHOR, VED ANVENDELSE AF EN PHOSPHOLIPASE, EN PHOS-
PHOLIPASE FRA EN TRÅDSVAMP, DER HAR EN PHOSPHOLIPASE
A OG/ELLER B AKTIVITET.

Bilagsfortegnelse:

- Dansk oversættelse af krav (T1) i 2 ekspl.
- Rettet dansk oversættelse af krav (T2) i 2 ekspl.
- Dansk oversættelse af patent (T3)
- Dansk oversættelse af ændret patent (T4)
- Rettet dansk oversættelse af patent (T5)
- Tegning
- Fuldmagt

Dato og underskrift: Bagsværd, 17. december 2002
Novozymes A/S

Sten Lottrup Knudsen

EP ansøgningsnummer: 97 610 056.0

EP publiceringsnummer: 0869167

EP patentnummer: 0869167

10.1-mar00/s

NZAS-0007561

Reduktion af phosphor-indeholdende bestanddele i spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase, en phospholipase fra en trådsvamp, der har phospholipase A og/eller B aktivitet.

Opfindelsens område

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til reduktion af indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase.

Den foreliggende opfindelse angår yderligere et enzym med phospholipase-aktivitet, en klonet DNA-sekvens, der koder for enzymet med phospholipase-aktivitet, en fremgangsmåde til frembringelse af enzymet og anvendelse af nævnte enzym til en række industrielle formål.

Opfindelsens baggrund

15 Enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en relativ stor mængde ikke-hydrerbart phosphorindhold

Anvendelsen af phospholipase til enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm) til at reducere phosphorindholdet i nævnte vanddegummeret spiseolie er velkendt.

Denne proces kan imidlertid forbedres yderligere, især til udførelse af enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor (NHP) og/eller relativt store mængder af mucilago.

25 Følgeligt er et formål for opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i sådanne olie, hvor nævnte fremgangsmåde omfatter anvendelse af en phospholipase.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen

Phospholipider, såsom lecithin eller phosphatidylcholin, består af glycerol, der er esterificeret med to fedtsyrer i den ydre (sn-1) og den midterste (sn-2) position og esterificeret med phosphorsyre i den tredje position; phosphorsyren igen kan være esterificeret til en aminoalkohol. Phospholipaser er enzymer, der tager del i hydrolysen af phospholipider. Adskillige typer af phospholipase-aktivitet kan skelnes fra hinanden, herunder phospholipaserne

A₁ (PLA₁) og A₂ (PLA₂), som hydrolyserer én fedtsyregruppe (i henholdsvis sn-1- og sn-2-positionen) til frembringelse af lysophospholipid, og lysophospholipase (eller phospholipase B (PLB)), som kan hydrolyser den resterende fedtsyregruppe i lysophospholipid.

5

Denne opfindelse angår blandt andet en phospholipase fra en trådsvamp, som har evnen til at hydrolyser den ene og/eller begge fedtsyregrupper i et phospholipid (det vil sige fremviser PLA- og/eller PLB-aktivitet).

10

Tidlige karakteriserede PLA- og/eller PLB-enzym fra svampe

Talrige referencer beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser. For at gøre det lettere at få et overblik over status inden for området, er referencerne blevet grupperet i to afsnit.

15

Afsnit ét vedrører referencer, som beskriver identificeringen af svampe-phospholipaser, som man aktuelt ikke mener er beslægtede med svampe-phospholipasen ifølge den foreliggende opfindelse. Disse referencer er hovedsageligt indbefattet for at sammenfatte status inden for området karakterisering af svampe-phospholipaser.

20

Afsnit to vedrører referencer, som beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser, som menes at være relevante for svampe-phospholipaserne ifølge den foreliggende opfindelse.

25

Afsnit ét

30

Enzymer med phospholipase A- og/eller B-aktivitet er blevet fundet i forskellige svampekilder, herunder *Penicillium notatum* (der også er kendt som *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem. 77:1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5):393-401, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem. 49(4):1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem. 269:19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (gammelt navn *Saccharomyces rosei*; Y.

35

Kuwabara, Agric. Biol. Chem. 52(10):2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters 124:29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60(7):1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-

zyme™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; Process Biochemistry 30(5):393-401 (1995)) og *Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., Agric. Biol. Chem. 43(3):517-525, 1979).

5 Afsnit to

EP 575133 A2 beskriver isoleringen og karakteriseringen af en svampe-phospholipase A1, som er opnået fra *Aspergillus*, og anvendelsen deraf til industrielle formål.

10 Der er ingen sekvensinformation (hverken DNA- eller aminosyre-) indbefattet i ansøgningen, ej heller er nogen strategi eller noget forslag til kloning af noget af *Aspergillus*-phospholipasen beskrevet eller anført i ansøgningen.

15 Tsung-Che et al. (Phytopathological notes 58:1437-38 (1968)) beskriver kort karakteriseringen af en phospholipase fra *Fusarium solani*.

EP 130 064 beskriver en isoleret fraktion af et fermenteringsmedium, der fremviser lipase-aktivitet, som er opnået fra stammen *Fusarium oxysporum* DSM 2672. Ydermere er anvendelsen deraf i detergentsammensætninger beskrevet. EP 130 064 beskriver imidlertid ikke denne fraktion som fremvisende phospholipase-aktivitet.

20 WO 96/13579 beskriver en lipase, som er opnået fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94, herunder dens N-terminale sekvens.

25 WO 96/13579 beskriver imidlertid ikke noget enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

30 En cDNA-sekvens, som koder for en lipase fra *Fusarium heterosporum* er beskrevet (Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*, J. Biochem. 116:536-540, 1994). Denne sekvens menes aktuelt at være den DNA-sekvens, der er mest beslægtet med en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)). Denne reference beskriver imidlertid ikke noget enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet.

En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne klonede DNA-sekvens har imidlertid meget begrænset homologi med en DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)).

5

Industriel anvendelse af phospholipaser

En række anvendelser af phospholipaser er kendte, såsom anvendelse af phospholipase i for eksempel enzymatisk degummering af en vanddegummeret olie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm), behandling af stivelseshydrolysat (især fra hvedestivelse) til forbedring af filtrerbarheden (EP 219 269, CPC International), som tilsætningsstof til brøddej til at forbedre brødets elasticitet (US 4 567 046, Kyowa Hakko), og til fremstilling af lysolecithin med specielle emulgerende egenskaber.

10

15

Aktuelt anvendes phospholipasen Lecitase® (Novo Nordisk A/S) kommersielt til for eksempel degummering af olier. Lecitase® er et mammalia-enzym, som er opnået fra svinepancreas.

20

Det er velkendt, at det er muligt at danne svampeenzyme rekombinant med opnåelse af industrielt økonomisk acceptable udbytter, især fra trådsvampe.

25

Følgeligt er det et formål for denne opfindelse at tilvejebringe en forbedret phospholipase til anvendelse for eksempel i processerne, der er beskrevet ovenfor.

30

Det er endvidere et formål for den foreliggende opfindelse at beskrive processer og fremgangsmåder til rekombinant produktion med industrielt acceptable udbytter af en phospholipase, som er opnået fra en trådsvamp.

Sammendrag af opfindelsen

35

Vanddegummering af spiseolier udføres ved hjælp af ekstraktion med vand. Ved denne behandling efterlades en del af phosphatiderne i olien. Denne del beskrives ved hjælp af fællesbetegnelsen "ikke-hydrerbare phosphatider" (NHP). Ved produktionen af olier er det essentielt at fjerne NHP-indholdet (US

5 264 367).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i en olie, som omfatter en relativ stor mængde af NHP.

5

Følgeligt angår opfindelsen i et første aspekt en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som har et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, der er målt ved hjælp af:

10

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

15

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

20

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer, og

25

vi) herefter udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien,

30

og hvor nævnte fremgangsmåde omfatter:
kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5-8 og en vandig opløsning af en phospholipase A1, en phospholipase A2 eller en phospholipase B, idet opløsningen emulgeres i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

35

I et andet aspekt angår opfindelsen en ny klonet phospholipase.

Yderligere undersøgelser af karakteren af lipase-aktiviteten, som findes i *Fusarium oxysporum* DSM 2672 (og er beskrevet i EP 130 064), viste, at den isolerede fraktion omfatter adskillige bestanddele med lipase-aktivitet, hvoraf den ene fremviste phospholipase-aktivitet.

5 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klone et enzym, som fremviser phospholipase A-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, mere specifikt 10 *Fusarium oxysporum*.

Dette er første gang en phospholipase A fra en trådsvamp er blevet klonet, og 15 følgeligt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en klonet DNA-sekvens, som koder for et phospholipase A-enzym fra en trådsvamp.

15 Følgeligt angår ét aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, som koder for et polypeptid med phospholipase A-aktivitet, hvor DNA-sekvensen er opnået fra en trådsvamp.

20 En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet i Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991.

Denne DNA-sekvens fremviser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed 25 på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og endvidere varierer en fysiologisk egenskab, såsom molekylemassen, betydeligt mellem nævnte PLB fra *P. notatum* (66 kDa) og en phospholipase ifølge opfindelsen (29 ± 10 kDa (se nedenfor)).

30 Endvidere har en sammenligning med kendte nukleotid- og aminosyresekvenser vist, at DNA-sekvensen og/eller den tilsvarende kodede aminosyresekvens ifølge opfindelsen kun har ringe homologi med alle kendte DNA- og/eller aminosyresekvenser (se nedenfor).

35 Følgelig mener man aktuelt, at DNA-sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning, vil være meget værdifuld til for eksempel kloning af en anden beslægtet/homolog phospholipase-kodende DNA-sekvens, da en specifik hybridiseringsprobe og/eller PCR-primere nu let kan konstrueres på

basis af nævnte DNA-sekvens ifølge opfindelsen.

Yderligere mener man aktuelt, at det er muligt at klone både en
5 beslægtet/homolog phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-
sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den
foreliggende ansøgning.

Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt en klonet DNA-sekvens, som
10 koder for et enzym, der fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-
aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

- (a) den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet
ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 15 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,
mere fortinvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere
fortinvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1, eller den komplementære
streg dertil,
- 20 (c) en DNA-sekvens, der er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-
sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),
- (d) en DNA-sekvens, der er defineret i (a) eller (b), som koder for et
25 polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog
med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
eller mere fortinvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er
vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- 30 (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-
probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ
ID NO: 1, ved lav stringens,
- (f) en DNA-sekvens, som koder for et polypeptid, der har de samme
35 aminosyresekvenser i positionerne 1 til 346, 31 til 303 eller 31 til 303 i SEQ
ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken
som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

(g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specifiseret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).

5 Endvidere er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet grundigt karakteriseret, og det har vist sig, at den har phospholipase-aktivitet ved lavt pH, denne egenskab gør den meget egnet til anvendelse til oliedegummering. Phospholipasen er ikke membranbundet, hvilket gør den egnet til kommercial produktion og oprensning.

10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

- 15 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
- ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
- iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
- 20 iv) et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
- v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C.

25 En udledt aminosyresekvens for en isoleret phospholipase ifølge opfindelsen er vist i SEQ ID NO: 2.

30 Den N-terminale aminosyresekvens for en moden secerneret isoleret phospholipase er blevet bestemt. Nævnte N-terminale sekvens viste, at den modne del af en phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, starter i aminosyre nr. 31 i SEQ ID NO: 2. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

35 Endvidere er den C-terminale sekvens for en aktiv secerneret phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, blevet bestemt. Nævnte C-terminal-bestemte phospholipase blev rekombinant

udtrykt i trådsvampestammen *Aspergillus oryzae*. Se forsøgseksempel heri for yderligere henvisning.

5 Disse resultater viste, at enzymet blev C-terminalt processeret under ekspression fra *A. oryzae*, og resultaterne tyder på, at Ser303 i SEQ ID NO: 2 er den mest sandsynlige C-terminale rest i det udtrykte modne aktive enzym. Det forudsæs imidlertid, at endnu yderligere C-terminal processering kan finde sted (det vil sige, som frembringer et fragment af nævnte sekvenser), og at man stadig har et udtrykt modent aktivt enzym.

10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller B-aktivitet og er valgt fra gruppe, der omfatter:

15 (a) et polypeptid, som kodes af den phospholipase A- og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

20 (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

25 (d) en analog til polypeptider, der er defineret i (a), (b) eller (c), idet analogen er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

(e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

30 I endnu et yderligere aspekt tilvejebringer opfindelsen en rekombinant ekspressionsvektor, som åbner mulighed for heterolog rekombinant produktion af et enzym ifølge opfindelsen. Det er derved muligt at lave en stærkt oprenet phospholipase-sammensætning, som er kendtegnet ved at være fri for homologe urenheder. Det er yderst fordelagtigt til en række industrielle
35 anvendelser.

Den foreliggende opfindelse viser eksperimentelt (se nedenfor), at en

phospholipase, der er opnået fra en stamme af *Fusarium culmorum* og *Fusarium oxysporum*, har forbedrede egenskaber til anvendelse til industrielle relevante formål. Det forudsese, at phospholipaser, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, vil have forbedrede egenskaber, der er relevante til anvendelse til industrielle formål.

Følgeligt angår opfindelsen i endnu et yderligere aspekt anvendelsen af en phospholipase, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *Fusarium oxysporum*, i en proces, der omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtsyregrupperne.

Endelig angår opfindelsen en isoleret, i det væsentlige ren biologisk kultur af *Escherichia coli*-stammen DSM 11299, som indeholder en phospholipase-kodende DNA-sekvens (den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299), der er opnået fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, eller en hvilket som helst mutant af nævnte *E. coli*-stamme, som har bevaret den phospholipase-kodende egenskab.

Homologisammenligning med kendte sekvenser

Der blev udført en homologisøgning med phospholipasen ifølge opfindelsen mod nukleotid- og proteindatabaser. Homologisøgningen viste, at den tættest beslægtede kendte sekvens var en lipase fra *Fusarium heterosporum* (en parallelstilling af aminosyrer er vist i figur 1).

DNA-sekvensen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 1, 23-1060), som koder for phospholipasen, viser kun 62 % DNA-homologi med den kendte lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum* (Genbank-databaserefrence S77816), og den tilsvarende aminosyresekvence for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 60 % homologi med en udlejt aminosyresekvence på basis af den kendte DNA-sekvens ovenfor (se figur 1).

Dette viser, at DNA- og/eller aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen rent faktisk er forskellig fra alle kendte DNA- og/eller

aminosyresekvenser.

En cDNA-sekvens, der koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum* er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne DNA-sekvens (Genbank-databaserefrence X60348) viser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 20 % lighed med en udledt aminosyresekvens, der er baseret på den kendte PLB-DNA-sekvens ovenfor.

Beregningerne af homologi blev udført som beskrevet senere i denne specifikation.

15 Tegninger

Figur 1: Parallelstilling af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2 med en kendt lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum*.

Figur 2: Sammenligning af enzymatisk degummeringsevne hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen.

Definitioner

25 Før en mere detaljeret gennemgang af denne opfindelse vil følgende udtryk blive defineret.

"En klonet DNA-sekvens": Udtrykket "en klonet DNA-sekvens" henviser til en DNA-sekvens, der er klonet ifølge standard-kloningsprocedurer, som anvendes ved gensplejsning til at flytte et segment af DNA fra dens naturlige placering til et andet site, hvor det vil blive reproduceret. Kloningsprocessen inddrager udskæring og isolering af det ønskede DNA-segment, insertion af DNA-stykket i vektormolekylet og inkorporering af den rekombinante vektor i en celle, hvor talrige kopier eller kloner af DNA-segmentet vil blive replikeret.

35 Den "klonede DNA-sekvens" ifølge opfindelsen kan alternativt benævnes "en DNA-konstruktion", "et klonet polynukleotid med en DNA-sekvens" eller "en

isoleret DNA-sekvens".

5 "Opnået fra": Til formålet i den foreliggende opfindelse betyder udtrykket "opnået fra" som anvendt heri i forbindelse med en specifik mikrobiel kilde, at enzymet og følgeligt DNA-sekvensen, der koder for nævnte enzym, er dannet af den specifikke kilde eller af en celle, hvori et gen fra kilden er blevet indsatt.

10 "Et isoleret polypeptid": Som defineret heri henviser udtrykket "et isoleret polypeptid" eller "en isoleret phospholipase" som anvendt om phospholipasen ifølge opfindelsen til en phospholipase eller phospholipasedel, som i det væsentlige er fri for andre ikke-phospholipase-polypeptider, for eksempel mindst 20 % ren, fortrinsvis mindst 40 % ren, mere fortrinsvis 60 % ren, endnu mere fortrinsvis 80 % ren, mest fortrinsvis 90 % ren og endnu mest fortrinsvis 95 % ren, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE.

15 Når det isolerede polypeptid er mindst 60 % rent kan udtrykket "et stærkt isoleret polypeptid" anvendes. Det "isolerede polypeptid" kan alternativt benævnes "oprenset polypeptid".

20 "Homologe urenheder": Som anvendt heri betyder udtrykket "homologe urenheder" en hvilken som helst urenhed (for eksempel et andet polypeptid end enzymet ifølge opfindelsen), som stammer fra den homologe celle, hvorfra enzymet ifølge opfindelsen oprindeligt er opnået. I den foreliggende opfindelse kan den homologe celle for eksempel være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

25 "Phospholipase-kodende del": Som anvendt heri betyder udtrykket "phospholipase-kodende del", når det anvendes i forbindelse med en DNA-sekvens, det område af DNA-sekvensen, som svarer til det område, der er translateredet til en polypeptidsekvens.

30 I DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, er det området mellem den første "ATG"-startkoden ("AUG"-kodon i mRNA) og den følgende stopkodon ("TAA", "TAG" eller "TGA").

35 Det translaterede polypeptid kan yderligere foruden den modne sekvens, som fremviser phospholipase-aktivitet, omfatte et N-terminalt signal og/eller en

propeptidsekvens. Signalsekvensen styrer almindeligvis sekretionen af polypeptidet, og propeptidet styrer almindeligvis foldningen af polypeptidet. For yderligere information se Egnell, P., et al., Molecular Microbiol. 6(9):1115-19 (1992) eller Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

5 "Modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens": Udtrykket "modifikation(er)", der anvendes i forbindelse med modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens som beskrevet heri, defineres til at indbefatte 10 kemisk modificering såvel som genmanipulation(er). Modificeringen eller modificeringerne kan være substitution, deletion og/eller insertion i aminosyren eller aminosyrerne af interesse.

15 "Phospholipase A": Udtrykket "phospholipase A", som anvendes heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen, påtænkes at dække et enzym med phospholipase A1- og/eller phospholipase A2-aktivitet.

20 Phospholipase A1 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.32.
Officielt navn: phospholipase A1 (PLA1).
Katalyseret reaktion:
phosphatidylcholin + h(2)o <>
2-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.
Kommentar(er): har en meget bredere specificitet end EC 3.1.1.4.

25 Phospholipase A2 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.4.

Officielt navn: phospholipase A2 (PLA2).
Alternativt navn(e): phosphatidylcholin 2-acylhydrolase, lecithinase a, 30 phosphatidase eller phosphatidolipase.
Katalyseret reaktion:
phosphatidylcholin + h(2)o <>
1-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.
Kommentar(er): virker også på phosphatidylethanolamin, cholinplasmalogen 35 og phosphatider, idet den fjerner fedtsyren, der er bundet til 2-positionen.

"Phospholipase B": defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC

3.1.1.5.

Officielt navn: lysophospholipase.

Alternativt navn(e): lecithinase b, lysolecithinase, phospholipase b eller plb.

Katalyseret reaktion:



10 "Phospholipase-aktivitet": Udtrykket "phospholipase-aktivitet" eller "har/fremviser phospholipase-aktivitet" påtænkes som anvendt heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen at specificere et enzym, som mindst har den mængde phospholipase-aktivitet (hvor enten det er PLA eller PLB), der defineres eksperimentelt nedenfor.

15 Følgeligt defineres et enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet, heri som et enzym, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6 heri (se nedenfor), har en phospholipase-aktivitet på mindst 0,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/min., 20 enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C.

25 Man mere på nuværende tidspunkt, at kun et enzym med en sådan signifikant phospholipase-aktivitet har industriel interesse, for eksempel til anvendelse til degummering (US 5 264 367).

30 "En lipase med phospholipase-sideaktivitet": Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med en phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal.

35 En række lipaser har en sådan phospholipase-sideaktivitet. I forsøgseksempel 6 heri (se nedenfor) er vist nogle af lipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

"En råolie": En råolie (kaldes også en ikke-degummeret olie) kan være en presset eller ekstraheret olie eller en blanding deraf fra for eksempel rapsfrø,

sojabønne eller solsikke. Phosphatid-indholdet i en råolie kan variere fra 0,5-3 % (vægt/vægt) svarende til et phosphorindhold i intervallet 200-1200 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 250-1200 ppm. Bortset fra phosphatiderne indeholder råolien også små koncentrationer af carbohydrater, sukkerforbindelser og metal/phosphatidsyre-komplekser med Ca, Mg og Fe.

5 "En semiråolie": En hvilken som helst olie, som ikke er en råolie, men som har et phosphatid-indhold på over 250 ppm, mere fortrinsvis på over 500 ppm. En sådan olie kunne for eksempel opnås ved at udsætte en råolie for en proces 10 tilsvarende "vanddegummeret olie"-processen, der er beskrevet nedenfor.

15 "En vanddegummeret olie": En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande 1-3 % (vægt/vægt) varm vand med varm (60-90 °C) råolie. Sædvanlige behandlingstider er 30-60 minutter. Vanddegummeringstrinet fjerner phosphatiderne og slimagtige gummier, som bliver uopløselige i olien, når de hydreres. De hydrerede phosphatider og gummier kan separeres fra olien ved hjælp af fældning, filtrering eller centrifugering - idet centrifugering er den mest almindelige metode.

20 Det essentielle formål med nævnte vanddegummeringsproces er at separere de hydrerede phosphatider fra olien. Blandingen af varmt vand i olien, der er beskrevet ovenfor, skal heri forstås bredt som blanding af en vandig oplosning i olien ifølge kendte standard-vanddegummeringsprocedurer.

25 Alternativt kan processen, som her benævnes "vanddegummering af olie", kaldes "vådraffinering til fjernelse af mucilago" (se US 5 264 367).

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

30 En fremgangsmåde til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbare phosphatider/phospholipider

Til den foreliggende opfindelse måles mængden af ikke-hydrerbart phosphor i en spiseolie ved hjælp af:

35 i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en oplosning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie =

4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

- 5 ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,
- 10 iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,
- 15 iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,
- v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand (til bundfældning) i 24 timer, og
- vi) efter bundfældning udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien.

For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

- 20 Som illustreret i forsøgseksemplerne heri varierer phospholipidsammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) betydeligt i forskellige spiseolier. Følgeligt vil niveauet af resterende phospholipid i forskellige vanddegummerede olier varierer over et bredt interval (for eksempel fra ca. 30 ppm til 200 ppm).
- 25 Til enzymatisk degummering afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede efter vanddegummering eller citronsyre/vand-forbehandling som defineret ovenfor.
- 30 Endvidere gælder det, at jo højere mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede i olien, er, jo mere effektiv er den enzymatiske degummeringsmetode.
- 35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i olie, som omfatter en relativ høj mængde af NHP.
- Fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 60 ppm, mere fortrinsvis mindst 100 ppm og endnu mere fortrinsvis mindst 200

ppm.

- 5 Mere fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold i intervallet 60-500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 100-500 ppm og endnu mere fortrinsvis i intervallet 200-500 ppm.
- 10 En spiseolie, der ifølge beskrivelsen heri er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor kan være en vanddegummeret olie eller mere fortrinsvis en råolie eller en semiråolie.
- 15 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelse, hvor nævnte spiseolie er en råolie, som er kendetegnet ved at nævnte råspiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er en olie med et phosphorindhold på over 250 ppm (part per million), idet olien ikke er blevet vanddegummeret (vanddegummering omfatter blanding af varmt vand i en varm råolie, efterfulgt af fjernelse af phosphatider, som bliver uopløselige i olien, når den hydreres) før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.
- 20 En sådan råspiseolie har fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold på over 350 ppm, mere fortrinsvis over 400 ppm, endnu mere fortrinsvis over 500 ppm, og mest fortrinsvis over 600 ppm.
- 25 Nævnte råspiseolie har endvidere fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold i intervallet 250-1500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 350-1500 ppm, endnu mere fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm og mest fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm.
- 30 Den enzymatiske degummeringsmetode af en råspiseolie ifølge opfindelsen er fordelagtig i forhold til kendte metoder til enzymatisk degummering af vanddegummerede spiseolier (US 5 264 367), da en direkte enzymatisk degummeringsmetode til behandling af en råolie ifølge opfindelse vil spare det første trin med vanddegumming af olien.
- 35 Dette sparer både tid og penge. En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande varmt vand i varm (60-90 °C) råolie i sædvanligvis 30-60 minutter. I

modsætning hertil kan den fulde proces til enzymtisk degummering af råolier ifølge opfindelsen udføres på mindre end 1 time med faktisk enzymatisk behandling i ca. 25 minutter. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

- .5 Endvidere kan en spiseolie, der er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor ifølge beskrivelsen heri, være en semiråolie.

Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelsen, hvor nævnte spiseolie er en semirå spiseolie, som er kendetegnet ved at nævnte semirå spiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har et phosphorindhold på over 500 ppm, og hvor nævnte olie er blevet vanddegummeret før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

15 Nævnte halvrå spiseolie er fortrinsvis en olie, som før udførelse af nævnte fremgangsmåde har et phosphorindhold på over 600 ppm, mere fortrinsvis over 750 ppm.

20 Almindeligvis vil vanddegummering af en spiseolie reducere phosphorindholdet i olien til et niveau på under 500 ppm.

25 Følgeligt er en semiråolie som beskrevet heri for eksempel måske kun blevet delvist vanddegummeret før udførelse af en fremgangsmåde til reduktion af niveauet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen.

30 Udtrykket "delvist vanddegummeret" angiver, at vanddegummeringsproceduren af olien kun har været en delvis/kort proces sammenlignet med en standard-vanddegummeringsprocedure.

35 En "delvis vanddegummerings"-proces kan udføres ved kun at blande 0,5 % varmt vand i olien (standard er 1-3 % varmt vand. Se afsnittet "Definitioner" heri) eller ved at reducere behandlingstiden til 10 minutter (standard er 30-60 minutter).

35 Alternativt kan en semiråolie som defineret heri være en blanding af en råolie og en semiråolie.

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde ifølge en hvilken som helst del af det første aspekt af opfindelsen, som omfatter følgende trin:

- 5 i) justering af temperaturen i spiseolien til en temperatur mellem 25 °C og 70 °C,
- 10 ii) forbehandling af spiseolien til ovennævnte justerede temperatur ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand, i 5-120 minutter, hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien,
- 15 iii) justering af pH i vand/olie-emulsionen til en pH mellem 1,5 og 8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning),
- 20 iv) kontaktbringning mellem vand/olie-emulsionen og en vandig opløsning af en phospholipase (ved en temperatur (± 5 °C), der er justeret ifølge trin i)), idet phospholipasen er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm,
- 25 v) separering af vandfasen fra den behandlede olie.

Temperaturen i spiseolien i trin i) umiddelbart ovenfor justeres fortrinsvis til en temperatur, som er den optimale temperatur for phospholipase-aktivitet for enzymet, der anvendes i fremgangsmåden.

For den kommersielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) er denne ca. 60 °C, og for en phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra trådsvampeslægten *Fusarium*, er den ca. 45 °C. Se forsøgseksempler heri for yderligere detaljer angående dette emne.

Det forudsese, at hovedparten af trådsvampe-phospholipaserne vil have et temperaturopimum omkring 35-50 °C.

35 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen fremgangsmåden, der er beskrevet umiddelbart ovenfor, hvor temperaturen i spiseolien i trin i) justeres til en temperatur mellem 35 °C og 50 °C, og phospholipasen, der anvendes i

trin iv) er opnået fra en trådsvampestamme.

- I trin ii) i fremgangsmåden ovenfor forbehandles spiseolien ved den justerede temperatur (trin i)) ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand i 5-120 minutter, og hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien.
- Dette trin er et standard-forbehandlingstrin ved enzymatisk degummering af spiseolier (US 5 264 367, US 5 558 781). Formålet med trin ii) er at hydrere de hydrerbare/hydrofile bestanddele (såsom det hydrerbare phosphorindhold) i spiseolien, som, når de hydreres, bliver uopløselige i olien.
- Dette trin er imidlertid anderledes end, hvad man benævner "vanddegummering af en spiseolie" i den foreliggende forbindelse. Én vigtig forskel er, at nævnte forbehandlingstrin ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien. Fjernelse af nævnte hydrerede indhold fra olien er hovedformålet med vanddegummering af spiseolier.
- Følgeligt omfatter olien stadig, når phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv) ovenfor, nævnte hydrerede phosphatider og mucilago.
- Med andre ord beskriver fremgangsmåden ovenfor, hvis spiseolien er en ikke-vanddegummeret spiseolie, en simplificeret degummeringsmetode, som ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien, før nævnte olie bringes i kontakt med phospholipasen.
- Den vandige opløsning, som omfatter mindst 85 % vand (trin ii ovenfor), omfatter fortrinsvis yderligere citronsyre. Der er fortrinsvis mellem 1-15 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning, mere fortrinsvis er der mellem 3-11 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning.
- Tidsrummet i trin ii) er fortrinsvis 15-50 minutter, og mere fortrinsvis 15-30 minutter.
- For yderligere detaljer angående nævnte forbehandling i trin ii) ovenfor henvises til forsøgseksemplerne heri.

- I trin iii) ovenfor justeres pH i vand/olie-emulsionen til pH 1,5-8 (for eksempel ved hjælp af tilsetning af en passende mængde af en NaOH-opløsning). Dette gøres for at justere pH-værdien i olien, før phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv). Almindeligvis vil den faktiske optimale pH-værdi afhænge af hvilket enzym, der anvendes til at blive bragt i kontakt med olien i trin iv). For yderligere detaljer angående dette emne henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 5 Almindeligvis foretrækkes det ifølge det første aspekt af opfindelsen og udførelsesformer for dette, at kontaktbringningen mellem nævnte olie og en vandig oplosning, som omfatter en phospholipase, udføres ved pH 1,5-6, mere fortrinsvis ved pH 3-6.
- 10 pH-værdien i vandet i olie-emulsionen måles ved at udtagte 2 ml vand fra olie-emulsionen og blande dem med 2 ml vand. Efter faseseparering skal det resulterende øverste olielag pipetteres fra, og pH skal måles i vandfasen. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af følgende formel: $pH_{real} = pH_{målt} - 0,38$. For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 15
- 20 I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er mængden af en phospholipase, som er emulgeret i olien, i intervallet 0,1-15 mg enzym (tørstof)/kg olie, mere fortrinsvis 0,25-5 mg enzym (tørstof)/kg olie og endnu mere fortrinsvis 0,25-2,5 mg enzym (tørstof)/kg olie.
- 25
- 30 Almindeligvis er det fordelagtigt at optimere både mængden af anvendt phospholipase og den anvendte tid til enzymatisk degummering af en spiseolie til opnåelse af et phosphorindhold på under 11 ppm. Den faktiske optimale enzymdosis og tiden vil blandt andet afhænge af hvilken phospholipase, der anvendes. For yderligere detaljer vedrørende optimering af enzymdosis og tiden for fremgangsmåden henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 35 I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet fortrinsvis til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,5-6 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 1-6 timer, mere fortrinsvis reduceres

phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,25-2,5 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

5

Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer vedrørende bestemmelsen af optimale temperaturer for individuelle phospholipasen.

10 I alle aspekter og udførelsesformer for en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet i olien fortrinsvis til mindre end 5 ppm.

15 Phosphorindholdet i olien måles som ppm (parts per million) i oliefasen i vandet, der er til stede i olieemulsionen. Analysen af phosphorindhold udføres i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7. udg. (1987)". For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er opnået fra en pattedyreart, især hvor phospholipasen er opnået fra pancreas i nævnte pattedyreart, og mest fortrinsvis hvor phospholipasen er opnået fra pancreas fra et svin.

25

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er phospholipasen fortrinsvis opnået fra en mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gær eller en bakterie.

30

Når trådsvamphen, der er nævnt ovenfor, er en art af slægten *Fusarium*, er foretrukne stammer fortrinsvis stammer, såsom en stamme af *Fusarium culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *F. oxysporum*.

35

Endvidere er foretrukne stammer, når nævnte trådsvamp ovenfor er en art af slægten *Aspergillus*, stammer, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især

Aspergillus oryzae.

- Endvidere er spiseolien i en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen fortrinsvis en sojabønneolie, solsikkefrøolie eller mere fortrinsvis en raspfrøolie.

Karakterisering af phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

- 10 En phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*, er blevet grundigt karakteriseret.

- 15 Følgeligt er et aspekt af opfindelsen fortrinsvis en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis her phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-7, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3,5-6, målt ved 40 °C, og endnu mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 4,5-5,5, målt ved 40 °C.

- 20 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat i et NEFA test bases assay eller i en buffer omfattende 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer.

- 25 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 5 kDa, endnu mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 3 kDa og mest fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 2 kDa.

- 30 Molekylemassen måles ved hjælp af SDS-PAGE-elektroforese som yderligere beskrevet i "Materialer og metoder"-afsnittet (se nedenfor).

- 35 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8, mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt

(pl) i intervallet 5-7,5 og endnu mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt (pl) i intervallet 5,5-7,5.

5 Det isoelektriske punkt (pl) blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

10 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; mere fortrinsvis i intervallet 30-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; og endnu mere fortrinsvis i intervallet 40-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5.

15 Temperaturopimummet for phospholipase-aktivitet blev målt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved pH 5. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

20 I endnu en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 7-11,5 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 8-11 ved 37 °C, og endnu mere fortrinsvis i pH-intervallet 8,5-11 ved 37 °C.

25 pH-optimummet for phospholipase-aktivitet blev bestemt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved 37 °C. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen omfatter fortrinsvis mindst to ud af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst tre af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, endnu mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst fire af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, og mest fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen alle fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet.

Som beskrevet ovenfor er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet klonet, udtrykt rekombinant og oprenset, og de N-terminale og C-terminale sekvenser af det aktive sekcererede enzym er blevet bestemt.

5

Følgeligt angår en yderligere udførelsesform for opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, idet polypeptidet er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

- 10 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
 ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
 iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
15 iv) et temperaturopimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C,
 målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
 v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt
20 med lecithin som substrat ved 37 °C,

og yderligere omfatter en aminosyresekvens, der er valgt fra gruppen, som omfatter:

- 25 (a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
 (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
30 (c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
 (d) en analog til polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c), som er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

- (e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

I en udførelsesform for opfindelsen er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

I en yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A2-aktivitet, og i en endnu yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen en phospholipase med phospholipase B-aktivitet.

Fortrinsvis er nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

For specifikke eksempler på standardteknikker til måling af individuel PLA1-, PLA2- og/eller PLB-aktivitet henvises til forsøgseksemplerne heri.

I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, målt som relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som mäter frigørelse af frie fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor den forholdsmaessige andel af phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er mere end 0,25, mere fortrinsvis mere end 0,5 og mest fortrinsvis mere end 0,80.

For yderligere detaljer vedrørende måling af afhængigheden for enzymaktiviteten af Ca^{2+} -koncentrationen henvises til forsøgseksempler heri.

Nogle lipaser kan have begrænset phospholipase-aktivitet. I den aktuelle forbindelse defineres en sådan begrænset phospholipase-aktivitet for nævnte lipaser som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet" (se afsnittet "Definitioner" heri). Den foreliggende opfindelse angår et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet, hvor phospholipase-aktiviteten for nævnte

isolerede polypeptid er så høj, at det har industriel relevans.

5 Følgeligt angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase med phospholipase-aktivitet, som er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:

10 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overflade af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroformopløsning,

15 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle,

20 c. en bufferopløsning (som ovenfor) indeholdende 60 µg enzym injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet",

25 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, aestimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) af DDPC.

30 Se afsnittet "Definitioner" og forsøgseksempler heri for yderligere beskrivelser af foretrukne mængder af phospholipase-aktiviteter for et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen.

35 Endvidere kan den specifikke phospholipase-aktivitet for en phospholipase ifølge opfindelsen måles ved hjælp af kendte standardassays for phospholipase-aktivitet.

Følgeligt angår den foreliggende opfindelse i en yderligere udførelsesform et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor

phospholipasen er en phospholipase, som har en phospholipase-aktivitet, der er i stand til at frigøre mindst 7 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst 15 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, endnu mere fortrinsvis mindst 30 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym og mest fortrinsvis mindst 50 μ mol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

phospholipase-aktivitet måles i et assay, der mäter frigørelse af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, der omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

For yderligere detaljer vedrørende denne udførelsesform for opfindelsen henvises til forsøgseksemplerne heri.

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er meget egnet til udførelse af enzymatisk degummering af en spiseolie.

Følgeligt angår opfindelsen:

et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie, ifølge en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm), hvorved phosphorindholdet i olien reduceres til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnteolie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som emulges i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandledeolie.

Det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er fortrinsvis i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummerede spiseolie (som defineret umiddelbart ovenfor) på mindre

end 1,5 timer og anvender mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie.

5 Et isoleret polypeptid, som fremviser phospholipase-aktivitet og har egenskaberne, der er vist ovenfor, ifølge opfindelsen opnås fortrinsvis fra en trådsvampestamme fra slægten *Fusarium*.

10 Uden at være begrænset af nogen teori forventes det imidlertid på nuværende tidspunkt, at en phospholipase ifølge opfindelsen også kan opnås fra en anden mikroorganisme, fortrinsvis en anden trådsvampestamme. Eksempler derpå er givet i afsnittet "Mikrobielle kilder" (se nedenfor).

Klonet DNA-sekvens

15 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se afsnittet "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klone en phospholipase, der fremviser PLA-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, nærmere bestemt *Fusarium oxysporum*.

20 Endvidere mener man på nuværende tidspunkt, at det er muligt at klone både en beslægtet phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning.

25 Følgeligt vedrører et aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

- (a) den phospholipase A-kodende del af polynukleotidet, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 30 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1 eller den komplementære streng dertil,
- 35 (c) en DNA-sekvens, som er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),

- (d) en DNA-sekvens som defineret i (a) eller (b), som koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, ved lav stringens,
- (f) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid med aminosyresekvenserne som resterne 1 til 346, 31 til 346 eller 31 til 303 i SEQ ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og
- (g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specifiseret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).
- I denne specifikation påtænkes en henvisning, når en sådan gøres til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299, også at indbefatte den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1.
- Følgeligt kan udtrykkene "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299" og "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1" bruges vilkårligt.
- DNA-sekvensen kan være af genomisk, cDNA eller syntetisk oprindelse eller en hvilken som helst kombination deraf.
- Den foreliggende opfindelse omfatter også en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet og har aminosyresekvensen, der er vist som den modne del i SEQ ID NO: 2, som adskiller sig fra SEQ ID NO: 1 som følge af degenereringen af den genetiske kode.

- 5 DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, og/eller en analog sekvens ifølge opfindelsen kan klones fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, som danner enzymet med phospholipase-aktivitet, eller en anden eller beslægtet organisme som yderligere beskrevet nedenfor (se afsnittet "Mikrobielle kilder").
- 10 Alternativt kan den analoge sekvens konstrueres på basis af DNA-sekvensen, der er vist som den phospholipase-kodende del af SEQ ID NO: 1, den kan for eksempel være et udsnit deraf og/eller konstrueres ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som ikke giver anledning til en anden aminosyresekvens for phospholipasen, der kodes af DNA-sekvensen, men svarer til kodonanvendelsen for værtsorganismen, som påtænkes til produktion af enzymet, eller ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som kan give anledning til en anden aminosyresekvens (det vil sige en variant til phospholipasen ifølge opfindelsen).
- 15 Når der udføres nukleotidsubstitutioner, er aminosyre-ændringerne fortrinsvis af en mindre betydende type, det vil sig konservative aminosyresubstitutioner, som ikke i betydelig grad påvirker proteinets foldning eller aktivitet; små deletioner, typisk af en til ca. 30 aminosyrer; små amino- eller carboxyterminale forlængelser, såsom en aminoterminal methioninrest; et lille linkerpeptid på op til ca. 20-25 rester; eller en lille forlængelse, som letter oprensningen, såsom et polyhistidin-område; en antigen epitop eller et bindingsdomæne.
- 20 Eksempler på konservative substitutioner er inden for gruppen af basiske aminosyrer, såsom arginin, lysin, histidin; sure aminosyrer, såsom glutaminsyre og asparaginsyre, polære aminosyrer, såsom glutamin og asparagin, hydrofobe aminosyrer, såsom leucin, isoleucin, valin, aromatiske aminosyrer, såsom phenylalanin, tryptofan, tyrosin, og små aminosyrer, såsom gycin, alanin, serin, threonin, methionin. For en generel beskrivelse af nukleotidsubstitution, se for eksempel Ford et al. (1991), *Protein Expression and Purification* 2:95-107.
- 25
- 30
- 35 Det vil være klart for fagfolk, at sådanne substitutioner kan foretages uden for de områder, der er kritiske for molekylets funktion, og stadig resultere i et aktivt

- polypeptid. Aminosyrer, der er essentielle for aktiviteten af polypeptidet, som kodes af den klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen og derfor fortørnsvis ikke har været genstand for substitution, kan identificeres i overensstemmelse med kendte procedurer, såsom sekvensstyret mutagenese eller alanin-scanningsmutagenese (cf. for eksempel Cunningham and Wells (1989), *Science* 244:1081-1085). I sidstnævnte teknik indføres mutationer i hver rest i molekylet, og de resulterende mutante molekyler testes for biologisk (for eksempel phospholipase-) aktivitet til identificering af aminosyrerester, der er kritiske for molekylets aktivitet. Sites for substrat-enzym-interaktion kan også bestemmes ved hjælp af en analyse af krystalstrukturen, der bestemmes ved hjælp af teknikker, såsom nuklear magnetisk resonans-analyses, krystallografi eller fotoaffinitetsmærkning (cf. for eksempel de Vos et al. (1992), *Science* 255:306-312; Smith et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 224:899-904; Wlodaver et al. (1992), *FEBS Lett.* 309:59-64).
- 15 Polypeptider ifølge den foreliggende opfindelse indbefatter også fusionerede polypeptider eller spaltbare fusionspolypeptider, hvori et andet polypeptid er fusioneret i N-terminalen eller C-terminalen af polypeptidet eller et fragment deraf. Et fusioneret polypeptid dannes ved hjælp af fusion af en nukleinsyresekvens (eller en del deraf), som koder for et andet polypeptid, til en nukleinsyresekvens (eller en del deraf) ifølge den foreliggende opfindelse. Teknikker til frembringelse af fusionerede polypeptider er kendte og indbefatter ligering af de kodende sekvenser, som koder for polypeptiderne, således at de er i læseramme, og således at ekspression af det fusionerede polypeptid er under kontrol af den samme promotor(er) og terminator.
- 20 DNA-sekvensen ifølge opfindelsen kan klones fra stammen *Escherichia coli* DSM 11299 ved anvendelse af standard-kloningsteknikker, for eksempel som beskrevet af Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.
- 25 Da den foreliggende opfindelse har løst problemet med udvikling af et egnet screeningsassay til anvendelse i en ekspressionskloningsteknik til kloning af en phospholipase ifølge opfindelse, se afsnittet med overskriften "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", kan DNA-sekvensen ifølge opfindelsen nu klones ved hjælp af en hvilken som helst generel metode, som inddrager:
- 30
- 35

- kloning i egnede vektorer af et cDNA-bibliotek fra en hvilken som helst organisme, der forventes at danne phospholipasen af interesse,
- 5 - transformation af egnede gærværtsceller med nævnte vektorer,
- dyrkning af værtscellerne under passende betingelser til ekspression af et hvilket som helst enzym af interesse, der kodes af en klon i cDNA-biblioteket,
- 10 - screening for positive kloner ved hjælp af bestemmelse af eventuel phospholipase-aktivitet hos enzymet, der dannes af sådanne kloner, og
- isolering af det enzymkodende DNA fra sådanne kloner.
- 15 Alternativt kan DNA'et, der koder for en phospholipase ifølge opfindelsen, da den foreliggende opfindelse for første gang tilvejebringer en klonet DNA-sekvens, som koder for et trådsvampe-PLA-enzym, i overensstemmelse med velkendte procedurer klones traditionelt fra en egnet kilde, såsom en hvilken som helst af organiserne, der er nævnt i afsnittet "Mikrobielle kilder", ved anvendelse af syntetiske oligonukleotidprober, der er fremstillet på basis af en DNA-sekvens, der er beskrevet heri. For eksempel kan en egnet oligonukleotidprobe fremstilles på basis af den phospholipase-kodende del af nukleotidsekvenserne, der er vist i SEQ ID NO: 1, eller et hvilket som helst egnet udsnit deraf eller på basis af aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.
- 20 Da endvidere en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, er en række af de specifikke udførelsesformer, som vedrører et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, også udførelsesformer for opfindelsen for en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet. Følgeligt vedrører referencer og foretrukne og mest foretrukne udførelsesformer for nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet også en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen.
- 25 30 35
- Som følge deraf vedrører en udførelsesform for opfindelsen en klonet DNA-

sekvens ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A1.

- I en yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A2, og i en endnu yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase B.
- 10 Fortrinsvis koder for nævnte klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen et polypeptid med phospholipase A1-aktivitet.
Endvidere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, der måles som:
- 15 15 - relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som mäter frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er et forhold, der er større end 0,25, mere fortrinsvis et forhold, der er større end 0,5.
- 20 20 Endnu yderligere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, der er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:
- 25 25 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overfalde af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroform-opløsning,
- 30 30 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for

DDPC på ca. 63 Å²/molekyle,

- 5 c. en bufferopløsning (som ovenfor), der indeholder 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet",
- 10 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget til opretholdelse af konstant overfladetryk, efterhånden som uoplöselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, aestimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

15 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelse, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, som er i stand til at frigøre mindst 7 µmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortinvis mindst 15 µmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

20 phospholipase-aktivitet måles i et assay, der mäter frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

25 I yderligere udførelsesformer angår opfindelsen:

30 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie i overensstemmelse med en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

35 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm) og derved reducere phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte

olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig oplosning af phospholipasen, som er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

- 5 En klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen er fortrinsvis en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummerede spiseolie ved anvendelse af mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvorved phospholipasen er i kontakt med
10 nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

Fremgangsmåde til kloning af en trådsvampe-phospholipase

- 15 Man stødte på en række tekniske vanskelighed, da man forsøgte at isolere en phospholipase ifølge opfindelsen eller klone et polynukleotid, som kodede for den. Det syntes umuligt at isolere enzymet, og problemet med kloning af polynukleotidet blev forfulgt.

- 20 Som beskrevet heri var der ingen kendt DNA-sekvens, som kodede en trådsvampe-phospholipase A, tilgængelig. Følgeligt udviklede de foreliggende opfindere en kloningsstrategi på basis af ekspressionskloning-i-gær-teknikken (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953).

- 25 Ét af de største problemer i forbindelse med denne teknik var, at gær danner en indre aktivitet, som giver anledning til en phospholipase-baggrund i udpladningsassays. Denne baggrund viste sig at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres omhyggeligt til at niveau, hvor baggrunden var lav nok, til at assayet
30 kunne være pålideligt under ekspressionsklonings-screeningsproceduren, men høj nok til at reaktionen kan finde sted.

- 35 Ydermere omfatter trådsvampestammer almindeligvis en række forskellige lipaser, hvoraf nogle endog fremviser begrænset phospholipase-aktivitet. Sådanne lipaser defineres heri som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet (se afsnittet "Definitioner" heri).

I udpladningsassayet viste baggrunden af sådanne lipaser med phospholipase-sideaktivitet sig også at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres endnu mere omhyggeligt for at eliminere baggrundsaktiviteten fra både gærcellerne og trådsvampelipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

Ud over dette viste det sig, at der skulle foretages et omhyggeligt valg af substrat, da mange ikke tilvejebragte nogen funktionel løsning på problemet, fordi en række af de testede phospholipase-substrater gav en baggrundsaktivitet, som skyldtes, at lipaser uden phospholipase-aktivitet var i stand til at reagere på substraterne. Følgeligt skulle et stort antal substrater testes og titreres for at identificere et egnet substrat.

Den fundne løsning til muliggørelse af udførelse af ekspressionskloning af et phospholipase-kodende polynukleotid var anvendelse af Lipoid E80 (fra Lipoid GmbH) i omhyggeligt målte koncentrationer. I "Materiale og metode"- afsnittet heri findes en detaljeret beskrivelse af den komplette ekspressionskloning-i-gær-metode, herunder et udpladningsassay, som løser de ovenfor beskrevne problemer.

20 Homologi/lighed for DNA-sekvenser

DNA-sekvenshomologien/ligheden, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens fra den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 5,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,3, fremviser det kodende område af DNA-sekvensen en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, mere fortrinsvis mindst 97 % med den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1 (det vil sige position 23-1063 i SEQ ID NO: 1), eller mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 113-

1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

5

Hybridisering

Hybridiseringen, der henvises til ovenfor, påtænkes at omfatte en analog DNA-sekvens, som hybridiserer til en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1063, eller mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 113-1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i det C-terminalt processerede secernerede aktive enzym) under i det mindste lave stringens-betingelser som beskrevet detaljeret nedenfor.

10 Egnede forsøgsbetingelser til bestemmelse af hybridisering ved lav, medium eller høj stringens mellem en nukleotidprobe og en homolog DNA- eller RNA-sekvens inddrager forudgående udblødning af filteret, der indeholder DNA-fragmenterne eller RNA'et, der skal hybridisere, i 5 x SSC (natriumchlorid/natriumcitrat, Sambrook et al., 1989) i 10 minutter og præhybridisering af filteret i en oplosning af 5 x SSC, 5 x Denhardt's oplosning (Sambrook et al., 1989), 0,5 % SDS og 100 µg/ml denatureret sonikeret laksesperma-DNA (Sambrook et al., 1989), efterfulgt af hybridisering i den samme oplosning, som indeholder 10 ng/ml af en vilkårlig primet (Feinberg, A.P., og Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13), ³²P-dCTP-mærket

15 (specifik aktivitet $> 1 \times 10^9$ cpm/µg) probe i 12 timer ved ca. 45 °C. Filteret vaskes herefter to gange i 30 minutter i 2 x SSC, 0,5 % SDS ved en temperatur på mindst 55 °C (lav stringens), mere fortrinsvis mindst 60 °C (medium stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 65 °C (medium/høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 70 °C (høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 75 °C (meget høj stringens).

20

25

30

35

Molekyler, hvortil oligonukleotidproben hybridiserer under disse betingelser,

påvises ved anvendelse af en X-røntgenfilm.

Det har vist sig, at det er muligt teoretisk at forudsige om to givne DNA-sekvenser vil hybridisere under bestemte specifikke betingelser.

5

Følgeligt kan forsøgsmetoden som et alternativ til den overfor beskrevne til bestemmelse af, om en analog DNA-sekvens vil hybridisere til nukleotidproben, baseres på en teoretisk beregning af den T_m (smeltetemperatur), hvorved to heterologe DNA-sekvenser med kendte sekvenser vil hybridisere under specificerede betingelser (for eksempel med hensyn til kation-koncentration og temperatur).

10

For at bestemme smeltetemperaturen for heterologe DNA-sekvenser ($T_m(\text{hetero})$) er det nødvendigt indledningsvis at bestemme smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for homologe DNA-sekvenser.

15

Smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for to helt komplementære DNA-strenge (homodupleksdannelse) kan bestemmes ved anvendelse af følgende formel:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5 \text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ form}) - (500/L)$$

20

("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), hvor:

"M" = den molære kation-koncentration i vaskebuffer,

"% GC" = % Guanin (G) og Cytosin (C) af det totale antal baser i DNA-sekvensen.

25

"% form" = % formamid i vaskebufferen, og

"L" = længden af DNA-sekvensen.

30

Ved anvendelse af denne formel og de eksperimentelle vaskebetingelserne, der er angivet ovenfor, er $T_m(\text{homo})$ for homodupleksdannelsen for nukleotidproben, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1060:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5 + 16,6(\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$$

$$T_m(\text{homo}) = 103,5 \text{ }^{\circ}\text{C}.$$

35

"M": 2 x SSC svarer til en kation-koncentration på 0,3 M,

"% GC": % GC i SEQ ID NO: 1, position 23-1060 er 56 %.

"% form": Der er intet formamid i vaskebufferen.

"L": Længden af SEQ ID NO: 1, position 23-1063 er 1038 bp.

5 Tm bestemt ved hjælp af ovennævnte formel er Tm for en homodupleksdannelse (Tm(homo)) mellem to helt komplementære DNA-
sekvenser. For at tilpasse Tm-værdien til en for to heterologe DNA-sekvenser, antager man, at en 1 % forskel i nukleotidsekvensen mellem de to heterologe sekvenser svarer til et fald på 1 °C i Tm ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995). Tm(hetero) for heterodupleksdannelsen findes derfor ved at trække homologi-%-forskellen 10 mellem den analoge sekvens, det drejer sig om, og nukleotidproben, der er beskrevet ovenfor, fra Tm(homo). DNA-homologiprocenten, som skal trækkes fra, beregnes som beskrevet heri (se nedenfor).

Homologi med aminosyresekvenser

15 Polypeptidhomologien, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens for den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-
20 sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 3,0 og GAP-
forlængelses-afskæring på 0,1, fremviser den modne del af et polypeptid, der 25 kodes af en analog DNA-sekvens, en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, især mindst 97 % med den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, det vil sige position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller 30 mere fortrinsvis med aminosyresekvensen, der er vist i position 31-303 i SEQ ID NO: 2 (position 303 er den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

35 Den foreliggende opfindelse er også rettet mod phospholipase-varianter med en aminosyresekvens, der adskiller sig i ikke mere end tre aminosyrer, fortrinsvis i ikke mere end to aminosyrer og mere fortrinsvis i ikke mere end en aminosyre fra den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID

NO: 2.

Endvidere angår de ovennævnte foretrukne aminosyreligheder også en analog til en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, idet denne sekvens koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet, og som er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortinvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der omfatter positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2.

10 Immunologisk krydsreaktivitet

Antistoffer, der skal anvendes til bestemmelse af immunologisk krydsreaktivitet, kan fremstilles ved anvendelse af en oprenset phospholipase. Mere specifikt kan der dannes antiserum mod phospholipasen ifølge opfindelsen ved hjælp af immunisering af kaniner (eller andre gnavere) i overensstemmelse med proceduren, der er beskrevet af Axelsen et al. i A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter. 23, eller A. Johnstone og R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Bladkwell Scientific Publications, 1982 (nærmere bestemt side 27-31). Oprensede immunoglobuliner kan opnås fra antiserumet, for eksempel ved hjælp af saltfældning ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), efterfulgt af dialyse og ionbytningskromatografi, for eksempel på DEAE-Sephadex. Immunokemisk karakterisering af proteiner kan udføres enten ved hjælp af Ouchterlony-dobbeltdiffusionsanalyse (O. Ouchterlony i: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), ved hjælp af kryds-immunelektroforese (N. Axelsen et al., supra, kapitel 3 og 4) eller ved hjælp af raket-immunelektroforese (N. Axelsen et al., kapitel 2).

30 Mikrobielle kilder

På prioriteringsdatoen for den foreliggende opfindelse er taksonomien, der anvendes nedenfor, i overensstemmelse med World Wide Web (WWW)-NCBI-taksonomi-browseren.

35 Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen kan opnås fra en hvilken som helst

mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gærcelle eller en bakterie.

5 Fortrinsvis kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme, hvor en foretrukken række er *Ascomycota*, hvor en foretrukken klasse er *Pyrenomycetes*, som omfatter den foretrukne familie *Nectriaceae*.

10 Mere fortrinsvis kan phospholipasen og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum* eller *F. solani*, især en stamme af *Fusarium oxysporum*.

15 Endvidere kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme fra slægten *Aspergillus*, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især *Aspergillus oryzae*.

20 Et isolat fra en stamme af *Fusarium oxysporum*, hvorfra en phospholipase ifølge opfindelsen kan opnås, er blevet deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

25 Deponeringsdato: 6. juni 1983
 Deponents ref.: NNO41759
 DSM-nr.: *Fusarium oxysporum* DSM-nr. 2672

30 Endvidere er ekspressionsplasmidet pYES 2.0, som omfatter den udforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, blevet transformeret ind i en stamme af *Escherichia coli*, som blev deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

35 Deponeringsdato: 25. november 1996

Deponents ref.: NNO49279
DSM-nr.: *Escherichia coli* DSM-nr. 11299

Ekspressionsvektorer

5

Ekspressionsvektoren ifølge opfindelsen kan være en hvilken som helst ekspressionsvektor, som på bekvem vis kan udsættes for rekombinant-DNA-procedurer, og valget af vektor vil ofte afhænge af værtscellen, hvori vektoren skal indføres. Vektoren kan således være en autonomt replikerende vektor, det vil sige en vektor, der findes som en ekstrakromosomal enhed, hvis replikation er uafhængig af kromosomal replikation, for eksempel et plasmid. Alternativt kan vektoren være en, der, når den indføres i en værtcelle, integreres i værtcellegenomet og replikeres sammen med kromosomet eller kromosomerne, hvori den er integreret.

15

I ekspressionsvektoren skal DNA-sekvensen, der koder for phospholipasen, være operationelt koblet til en egnet promotor- eller terminatorsekvens. Promotoren kan være en hvilken som helst DNA-sekvens, der fremviser transkriptionel aktivitet i den valgte værtscelle, og kan stamme fra gener, der koder for proteiner, som enten er homologe eller heterologe for værtscellen. Procedurerne, som anvendes til ligering af DNA-sekvenserne, der koder for phospholipasen, promotoren og terminatoren, og til insertion af disse i egnede vektorer er velkendte (cf. for eksempel Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

25

Eksempler på egnede promotorer til anvendelse i trådsvampeværtsceller er for eksempel ADH3-promotoren (McKnight et al., The EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) eller tpiA-promotoren. Eksempler på andre anvendelige promotorer er de, der stammer fra genet, der koder for *Aspergillus oryzae*-TAKA-amylase, *Rhizomucor miehei*-asparagin-proteinase, *Aspergillus niger*-neutral α -amylase, *Aspergillus niger*-syrestabil α -amylase, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus awamori*-glucoamylase (gluA), *Rhizomucor miehei*-lipase, *Aspergillus oryzae*-alkalisk protease, *Aspergillus oryzae*-triosephosphat-isomerase eller *Aspergillus nidulans*-acetamidase.

35

Værtsceller

- Den foreliggende opfindelse angår også rekombinante værtsceller, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, hvor cellerne med fordel kan anvendes i den rekombinante produktion af polypeptiderne. Udtrykket "værtscelle" omfatter et hvilket som helst afkom af en parentalcelle, som ikke er identisk med parentalcellen på grund af mutationer, der forekommer under replikation.
- Cellen transformeres fortrinsvis med en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, efterfulgt af integrering af vektoren i værtskromosomet.
- "Transformation" betyder indførelse af en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge den foreliggende opfindelse i en værtscelle, således at vektoren opretholdes som en kromosomalt integreret sekvens eller som en selvreplikerende ekstrakromosomal vektor. Integrering anses almindeligvis for at være en fordel, da det er mere sandsynligt, at nukleinsyresekvensen opretholdes stabilt i cellen. Integrering af vektoren i værtskromosomet kan forekomme ved hjælp af homolog eller ikke-homolog rekombination som beskrevet ovenfor.
- I en foretrukken udførelsesform er værtscellen en svampecelle. "Svampe" indbefatter som anvendt heri rækken *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* og *Zygomycota* (som defineret af Hawksworth et al., I: Ainsworth og Bisby's Dictionary of The Fungi, 8. udgave, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) såvel som *Oomycota* (som anført i Hawksworth et al., 1995, supra, page 171) og alle mitosporiske svampe (Hawksworth et al., 1995, supra). Repræsentative grupper af *Ascomycota* indbefatter for eksempel *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) og de egentlige gær, der er anført ovenfor. Eksempler på *Basidiomycota* indbefatter paddehatte, rust og brand. Repræsentative grupper af *Chytridiomycota* indbefatter for eksempel *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* og akvatiske svampe. Repræsentative grupper af *Oomycota* indbefatter for eksempel saprolegniomycetøse akvatiske svampe (vandskimmelsvampe), såsom *Achlya*. Eksempler på mitosporiske svampe indbefatter *Aspergillus*,

Penicillium, *Candida* og *Alternaria*. Repræsentative grupper af Zygomycota indbefatter for eksempel *Rhizopus* og *Mucor*.

I en foretrukken udførelsesform er svampeværtscelle en trådsvampecelle. 5 "Trådsvampe" indbefatter alle trådagtige former af undergruppen *Eumycota* og *Oomycota* (som defineret af Hawksworth et al., 1995, supra). Trådsvampene er kendtegnet ved et vegetativt mycelium, der består af chitin, cellulose, glucan, chitosan, mannan og andre komplekse polysaccharider. Vegetativ vækst sker ved hyfal forlængelse, og carbonkatabolismen er obligat aerob. I 10 modsætning hertil sker vegetativ vækst hos gær, såsom *Saccharomyces cerevisiae*, ved hjælp af knopskydning fra en unicellulær thallus, og carbonkatabolismen kan være fermentativ. I en mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en celle fra en art af men ikke begrænset til *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, 15 *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* og *Trichoderma* eller en teleomorf eller et synonym dertil. I en endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Acremonium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Mucor*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora*-celle. I 20 en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Tolypocladium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Trichoderma*-celle. I en mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus awamori*-, *Aspergillus foetidus*-, 25 *Aspergillus japonicus*-, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus oryzae*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle fra gruppen *Discolor* (også kendt som gruppen *Fusarium*). I en anden foretrukken udførelsesform er trådsvampeparentalcellen en *Fusarium*-stamme fra udsnittet *Elegans*, for eksempel *Fusarium oxysporum*. I en anden

5 mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola insolens*- eller *Thermomyces lanuginosa*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Rhizomucor miehei*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora thermophilum*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora crassa*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium purpurogenum*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia terrestris*-celle. I en anden mest foretrakken udførelsesform er *Trichoderma*-cellen en *Trichoderma harzianum*-, *Trichoderma koningii*-, *Trichoderma longibrachiatum*-, *Trichoderma reesei*- eller *Trichoderma viride*-celle.

15 Svampeceller kan transformeres ved hjælp af en proces, der inddrager protoplast-dannelse, transformation af protoplasterne og regenerering af cellevæggen på en måde, der er kendt per se. Egnede procedurer til transformation af *Aspergillus*-værtsceller er beskrevet i EP 238 023 og Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474. En egnet fremgangsmåde til transformation af *Fusarium*-arter er beskrevet af Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156 eller i sideløbende US serienr. 08/269 449. Gær kan transformeres ved anvendelse af procedurerne, der er beskrevet af Becker og Guarante, I: Abelson, J.N., og Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology 194:182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; og Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920. Mammaliaceller kan transformeres ved hjælp af direkte optagelse ved anvendelse af calciumphosphat-fældningsmetoden ifølge Graham og Van der Eb (1978, Virology 52:546).

30 Fremgangsmåde til frembringelse af phospholipase

35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til frembringelse af et isoleret enzym ifølge opfindelsen, hvorved en egnet værtscelle, som er blevet transformeret med en DNA-sekvens, der koder for enzymet, dyrkes under betingelser, der åbner mulighed for dannelsen af enzymet, og det resulterende enzym indvindes fra kulturen.

Når en ekspressionsvektor, der omfatter en DNA-sekvens, som koder for enzymet, transformeres ind i en heterolog værtscelle, er det muligt at åbne mulighed for heterolog rekombinant produktion af enzymet ifølge opfindelsen.

5 Derved er det muligt at opnå en stærkt oprenset phospholipase-sammensætning, som er kendtegnet ved at være fri for homologe urenheder.

I den foreliggende opfindelse kan den homologe værtscelle være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

10 Mediet, som anvendes til at dyrke de transformerede værtsceller, kan være et hvilket som helst traditionelt medium, som er egnet til dyrkning af de pågældende værtsceller. Den udtrykte phospholipase kan passende secerneres ud i dyrkningsmediet og indvindes derfra ved hjælp af velkendte procedurer, herunder separering af cellerne fra mediet ved hjælp af centrifugering eller filtrering, fældning af proteinagtige bestanddele i mediet ved hjælp af et salt, såsom ammoniumsulphat, efterfulgt af kromatografiske procedurer, såsom ionbytningskromatografi, affinitetskromatografi eller lignende.

15

20 Anvendelse af phospholipase

25 Foruden anvendelsen af en phospholipase i en ny fremgangsmåde ifølge opfindelse til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbart phosphor, er en række andre anvendelser af phospholipaser kendte.

Sådanne kendte anvendelser af phospholipaser er beskrevet nedenfor.

30 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i en hvilken som helst anvendelse, hvor det ønskes at hydrolysere fedtsyregruppen eller grupperne i et phospholipid eller lysophospholipid, såsom lecithin eller lysolecithin. Phospholipasen anvendes fortørnvis ved pH 3-10 og ved 30-70 °C (især 40-60 °C). Hvis det ønskes, kan phospholipasen inaktiveres efter reaktionen ved at udsætte den for varmebehandling, for eksempel ved pH 7, 80 °C i 1 time eller 90 °C i 10 minutter.

35

- Som eksempel kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i fremstillingen af dej, brød og kager, for eksempel til at forbedre brødets eller kagens elasticitet. Phospholipasen kan således anvendes i en proces til frembringelse af brød, som omfatter tilslætning af phospholipasen til bestanddelene i en dej, æltning af dejen og bagning af dejen til frembringelse af brød. Dette kan udføres analogt med US 4 567 046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) eller EP 426211 (Unilever).
- 5
- 10 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan også anvendes til at forbedre filtrerbarheden af en vandig opløsning eller opsløsning af carbohydrate oprindelse ved hjælp af behandling af den med phospholipasen. Dette er særligt anvendeligt til en opløsning eller opsløsning, som indeholder et stivelseshydrolysat, især et hvedestivelseshydrolysat, da denne har en tendens til at være vanskelig at filtrere og at give uklare filtrater. Behandlingen kan udføres analogt med EP 219 269 (CPC International).
- 15
- 20 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes til partiell hydrolyse af phospholipider, fortrinsvis lecithin, til opnåelse af forbedrede phospholipid-emulgeringsmidler. Denne anvendelse beskrives yderligere i produktark til Lecitase™ (Novo Nordisk A/S), som angår brugen deraf, og i Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Udgiver: VCH Weinheim (1996)).
- 25
- 30 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes i en proces til produktion af et dyrefoder, som omfatter blanding af phospholipasen med foderstoffer og mindst ét phospholipid. Dette kan gøres analogt med EP 743 017.
- 35 Degummering af plante-/spiseolier i overensstemmelse med kendte procedurer
- I overensstemmelse med kendte procedurer kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, som omfatter behandling af olien med phospholipasen til hydrolysering af hovedparten af phospholipiden og separering af en vandig fase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid fra olien. Denne proces

er anvendelig til oprensning af en hvilken som helst spiseolie, der indeholder phospholipid, for eksempel planteolie, såsom sojabønneolie, rapsfrøolie og solsikkeolie.

- 5 Før den enzymatiske behandling forbehandles planteolien fortrinsvis til fjernelse af slim (mucilago), for eksempel ved hjælp af vådraffinering. Olien vil typisk indeholde 50-250 ppm phosphor som phospholipid ved starten af behandlingen med phospholipase, og processen ifølge opfindelsen kan reducere denne værdi til under 11 ppm, mere fortrinsvis under 5 ppm.
- 10 Den enzymatiske behandling udføres ved hjælp af dispersion af en vandig opløsning af en phospholipase, fortrinsvis som små dråber med en gennemsnitlig diameter på under 10 µm. Mængden af vand er fortrinsvis 0,5-5 vægt-% i forhold til olien. Et emulgeringsmiddel kan eventuelt tilsettes.
- 15 Mekanisk bevægelse kan anvendes til opretholdelse af emulsionen.
- Den enzymatiske behandling kan udføres ved et hvilket som helst pH i intervallet 1,5-8. pH kan justeres ved hjælp af tilsetning af citronsyre, en citratbuffer eller HCl.
- 20 En passende temperatur er almindeligvis 30-70 °C (især 40-60 °C). Reaktionstiden vil typisk være 0,5-12 timer (for eksempel 2-6 timer), og en passende enzymdosis vil sædvanligvis være 100-5000 IU pr. liter olie, især 200-2000 IU/l.
- 25 Den enzymatiske behandling kan udføres batchvis, for eksempel i en tank med omrøring, eller kan være forløbende, for eksempel i en serie af omrørte reaktortanke.
- 30 Den enzymatiske behandling følges af separering af en vandfase og en oliefase. Denne separering kan udføres ved hjælp af traditionelle midler, for eksempel centrifugering.
- 35 I andre henseender kan processen udføres i overensstemmelse med kendte principper, for eksempel analogt med US 5 264 367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM 6(12):1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol. 95(8):300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); eller

EP 654 527 (Metalgesellschaft, Röhm).

Anvendelse af en phospholipase ifølge opfindelsen til bagning

5 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i brød-forbedrende additiver, for eksempel dejsammensætninger, dejadditiver, dejkonditioneringsmidler, færdigblandinger og tilsvarende præparater, som traditionelt tilsættes til melet og/eller dejen i løbet af processer til frembringelse af brød eller andre bagte produkter til tilvejebringelse af forbedrede egenskaber for brød eller andre bagte produkter.

10

En udførelsesform for opfindelsen angår derfor en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning, og endvidere anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen i sådanne sammensætninger og en dej eller et bagt produkt, som omfatter en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen.

15

I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykkene "brødforbedrende sammensætning" og "dejforbedrende sammensætning" at angive sammensætninger, som foruden enzymbestanddelen kan omfatter andre stoffer, som traditionelt anvendes til bagning til forbedring af dejens og/eller de bagte produkters egenskaber. Eksempler på sådanne bestanddele er anført nedenfor.

20

25 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "forbedrede egenskaber" at angive en hvilken som helst egenskab, der kan forbedres ved hjælp af virkningen af et phospholipase-enzym ifølge opfindelsen. Især resulterer anvendelsen af phospholipase i et forøget volumen og en forbedret krummestruktur og anti-"friskhedstab"s-egenskaber hos det bagte produkt, såvel som en forøget styrke, stabilitet og reduceret klæbetilbøjelighed og derved forbedret maskinbearbejdelighed hos dejen. Effekten på dejen har vist sig at være særlig god, når der anvendes en mel af ringe kvalitet. Den forbedrede maskinbearbejdelighed har særlig betydning i forbindelse med dej, der skal bearbejdes industrielt.

30

35 De forbedrede egenskaber vurderes ved hjælp af sammenligning med dej og/eller bagte produkter, der er fremstillet uden tilsætning af phospholipase

ifølge den foreliggende opfindelse.

- Den brød- og/eller dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen kan yderligere omfatte et andet enzym. Eksempler på andre enzymer en cellulase, en hemicellulase, en pentosanase (der er anvendelig til partiell hydrolyse af pentosaner, som øger dejens udvidelsesevne), en glucoseoxidase (der er anvendelig til at gøre dejen stærkere), en lipase (der er anvendelig til modificering af lipider, der er til stede i dejen eller dejbestanddele til blødgøring af dejen), en peroxidase (der er anvendelig til forbedring af dejkonsistensen), en protease (der er anvendelse til glutensvækkelse, især ved anvendelse af hård hvedemel), en peptidase og/eller en amylase, for eksempel α -amylase (der er anvendelig til tilvejebringelse af sukker, der kan fermenteres ved hjælp af gær).
- Endvidere eller som et alternativ til andre enzymbestanddele kan den dejforbedrende og/eller brødforbedrende sammensætning omfatte et traditionelt anvendt bagemiddel, for eksempel en eller flere af følgende bestanddele:
- Et mælkepulver (som tilvejebringer skorpefarve), gluten (til at forbedre svage meles gastilbageholdesesstyrke), et emulgeringsmiddel (til at forbedre dejens udvidelsesevne og i nogen grad konsistensen af det resulterende brød), granuleret fedt (til blødgøring af dejen og for brødets konsistens), en oxidant (som tilsættes for at forstærke glutenstrukturen, for eksempel ascorbinsyre, kaliumbromat, kaliumiodat eller ammoniumpersulfat), en aminosyre (for eksempel cystein), en sukker og salt (for eksempel natriumchlorid, calciumacetat, natriumsulfat eller calciumsulfat, hvis funktion er at gøre dejen fastere), mel eller stivelse.
- Eksempler på egnede emulgeringsmidler er mono- eller diglycerider, diacetylvinylsyre-estere af mono- eller diglycerider, sukker-estere af fedtsyrer, polyglycerol-estere af fedtsyrer, mælkesyre-estere af monoglycerider, eddikesyre-estere af monoglycerider, polyoxyethylenstearater, phospholipider og lecithin.
- I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "bagt produkt" at indbefatte et hvilket som helst produkt, der er fremstillet af dej, som enten har

en blød eller en sprød karakter. Eksempler på bagte produkter, hvad enten de er af hvid, lys eller mørk type, som med fordel kan fremstilles ved anvendelse af den foreliggende opfindelse, er brød (især hvidt brød, fuldkorns- eller rugbrød), typisk i form af hele brød eller kuvertbrød, fransk baguette-type brød, pitabrød, tacos, kager, pandekager, kiks, knækbrød og lignende.

Dejen ifølge opfindelsen kan være af en hvilken som helst af typerne, der er beskrevet ovenfor, og kan være frisk eller frosset.

10 Fra ovennævnte beskrivelse vil det fremgå, at dejen ifølge opfindelsen normalt er en surdej eller en dej, der skal syrnes. Dejen kan syrnes på forskellige måder, såsom ved hjælp af tilsætning af natriumbicarbonat eller lignende eller ved hjælp af tilsætning af en surdej (gærende dej), men det foretrækkes at syrne dejen ved hjælp af tilsætning af en egnet gærkultur, såsom en kultur af *15 Saccharomyces cerevisiae* (bagegær). En hvilken som helst af de kommersielt tilgængelige *S. cerevisiae*-stammer kan anvendes.

20 I en sidste udførelsesform angår opfindelsen anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen til fremstilling af pastadej, som fortrinsvis fremstilles af durummel eller en mel af sammenlignelig kvalitet. Dejen kan fremstilles ved anvendelse af traditionelle teknikker og phospholipasen anvendes i en tilsvarende dosis, som den der er beskrevet ovenfor. Phospholipasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, for eksempel som beskrevet heri. Det påtænkes, at phospholipasen, når den anvendes til fremstilling af pasta, resulterer i en forstærkning af glutenstrukturen og således 25 en reduktion i dejens klæbetilbøjelighed og en forbedret dejstyrke.

Anvendelse af lipaseaktivitet hos et enzym ifølge opfindelsen

30 Som vist i forsøgseksemplerne heri kan en phospholipase ifølge opfindelsen yderligere fremvise lipaseaktivitet.

35 Følgeligt angår opfindelsen yderligere anvendelsen af denne lipaseaktivitet i standardanvendelser af en lipase, især til anvendelse i rengørings- og detergentsammensætninger. Sådanne rengørings- og detergentsammensætninger er velbeskrevne, og der henvises til WO 96/34946, WO 97/07202 og WO 95/30011 for yderligere beskrivelser af

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på 5 nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

Deponerede organismer

10 *Fusarium oxysporum* DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA- sekvensen ifølge opfindelsen.

15 *Escherichia coli* DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

20 Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

E. coli-stamme: DH10B (Life Technologies).

25 Plasmider

30 *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

pA2PH10 (se eksempel 7).

35 Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

Med mindre andet er anført, blev DNA-manipuleringerne og transformationerne udført ved anvendelse af standardmetoder indenfor molekylærbiologi (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (red.), "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., og Cutting, S.M. (red.), "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

Enzymer til DNA-manipuleringer blev anvendt i overensstemmelse med specifikationerne fra leverandørerne.

Enzymer til DNA-manipuleringer

Med mindre andet er anført, er alle enzymer til DNA-manipuleringer, såsom for eksempel restriktionsendonukleaser, ligaser etc., leveret af New England Biolabs, Inc.

Phospholipase-aktivitetsassay på basis af Nef-C-test

- Substrat: L- α -lysophosphatidylcholin (Sigma).
 Substrat: Sojabønne-lecithin (Sigma nr. P3644). Anvendes til måling af phospholipase A-aktivitet.
 Nef-C-testkit er fra Wako Chemicals Germany.
 Buffer: 20 mM NaOAc, pH 4,5.
- Substratopløsning: 10 mg substrat i 1 ml milliQ-vand og 1 ml buffer (lav tilstrækkelig substratopløsning til alle prøver).
1. 15 μ l enzym tilskættes til 150 μ l substratopløsning.
 2. Inkubation i 10 minutter ved 40 °C.
 3. 30 μ l overføres til 300 μ l reagens 1 (fra Nef-C-kit).
 4. Inkubation i 10 minutter ved 37 °C.
 5. Tilsætning af 600 μ l reagens 2 (fra Nef-C-kit).
 6. Inkubation i 10 minutter ved 37 °C.
 7. Absorption for det endelige reaktionsprodukt måles ved 550 nm i overensstemmelse med Nef-C-testkit-instruktioner.

Den enzymaktivitet, der er nødvendig til frembringelse af 1 µmol fedtsyre pr. minut fra enzymreaktionen, defineredes som 1 enhed.

Ekspressionskloning i gær

5

Ekspressionskloning i gær blev udført som beskrevet udførligt af H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), der medtages heri som reference.

10 Alle individuelle trin i ekstraktion af totalt RNA, cDNA-syntese, mungbønnenukleleasebehandling, stump-endedannelse med T4-DNA-polymerase og konstruktion af biblioteker blev udført i overensstemmelse med referencerne, der er nævnt ovenfor.

15 Fermenteringsprocedure af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 til mRNA-isolering

20 *Fusarium oxysporum* DSM 2672 blev dyrket i YPD-medium i 4 dage ved 30 °C. 10 µl supernatant blev testet for phospholipase-aktivitet i udpladningsassayet, der er beskrevet nedenfor.

mRNA blev isoleret fra mycelium fra denne kultur som beskrevet i H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953.

25 Identificering af positive gærkloner (udpladningsassay)

Identificering af positive gærkloner (det vil sige kloner, som omfatter et gen, der koder for phospholipase-aktivitet) blev udført som beskrevet nedenfor.

30 Gærtransformanterne udplades på SC-agar, der indeholder 2 % glucose, og inkuberes i 3 dage ved 30 °C. Et celluloseacetat-filter (OE67, Schleicher & Schuell) anbringes ovenpå cellerne og overføres herefter til skålene, der indeholder SC-agar og 2 % galactose med cellerne ovenpå filteret. Efter 3 dages inkubation ved 30 °C overføres filteret med celler til substratskåle. 35 Positive kloner identificeres som kolonier, der fremkalder en blågrøn zone i substratskålen under kolonien.

Substratskålene er fremstillet på følgende måde: 2,5 g agar (BA-30 INA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) tilsættes til 137,5 ml H₂O, opvarmet til kogning i en mikrobølgeovn. Efter nedkøling til ca. 60 °C tilsættes 30 ml af følgende blanding: 62,5 ml 0,4 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) og 50 ml 3 % Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Tyskland), som er opløst i 2 % Triton X-100 (volumen/volumen), og 0,5 ml 2 % Brilliant Green-opløsning i H₂O. Koncentrationen af substratet er vigtig. Hvis koncentrationen er for høj, kan det give anledning til baggrundsaktivitet fra gærceller og/eller fra trådsvampelipaser med phospholipase-sideaktivitet.

10

Isolering af et cDNA-gen til ekspression i *Aspergillus*

En phospholipase-producerende gærkoloni podes i 20 ml YPD-medium i et 50 ml-glas-reagensglas. Reagensglasset rystes i 2 dage ved 30 °C. Cellerne høstes ved hjælp af centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm.

DNA isoleres ifølge WO 94/14953 og opløses i 50 ml vand. DNA'et transformeres ind i *E. coli* ved hjælp af standardprocedurer. Plasmid-DNA isoleres fra *E. coli* ved anvendelse af standardprocedurer og analyseres ved hjælp af restriktionsenzymanalyse. cDNA-insertet skæres ud ved anvendelse af passende restriktionsenzym og ligeres ind i en *Aspergillus*-ekspressionsvektor.

25

Transformation af *Aspergillus oryzae* eller *Aspergillus niger*

Protoplaster kan fremstilles som beskrevet i WO 95/02043, side 6, linie 2 - side 17, linie 12, der medtages heri som reference.

100 µl af protoplast-suspensionen blandes med 5-25 µg af det behørigé DNA i 30 10 µl STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Protoplaster blandes med p3SR2 (et *A. nidulans*-amdS-gen-indeholdende plasmid). Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter. 0,2 ml 60 % PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, tilsættes og blandes omhyggeligt (to gange), og til sidst tilsættes 0,85 ml af den samme opløsning og blandes omhyggeligt. Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter, centrifugeres ved 2500 x g i 15 minutter, og pelleten resuspenderes i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter endnu en sedimentering spredes

5 protoplasterne i minimale skåle (Cove, Biochem. Biophys. Acta (1966), 113:51-56), som indeholder 1,0 M sucrose, pH 7,0, 10 mM acetamid som nitrogen-kilde og 20 mM CsCl til hæmning af baggrundsvækst. Efter inkubation i 4-7 dage ved 37 °C udtages sporer og spredes til enkeltkolonier. Denne procedure gentages, og sporer fra en enkeltkoloni efter den anden reisolering opbevares som en defineret transformant.

Test af *Aspergillus oryzae*- eller *Aspergillus niger*-transformanter

10 Hver af *Aspergillus oryzae*-transformanterne podes i 10 ml YPM (cf. nedenfor) og opformeres. Efter 2-5 dages inkubation ved 30 °C fjernes supernatanten. 20 µl supernatant påføres i huller, der er stukket i substratpladen (se ovenfor). Efter 1-24 timer viser phospholipase-aktivitet sig som en blågrøn zone omkring hullet.

15 Tilførsels-batchfermentering

20 Tilførsels-batchfermentering blev udført i et medium, som omfattede maltodextrin som carbonkilde, urinstof som nitrogenkilde og gærkstrakt. Tilførsels-batchfermenteringen blev udført ved hjælp af podning af en rystekolbekultur af *A. oryzae*-værtsceller af interesse i en medium, som omfattede 3,5 % af carbonkilden og 0,5 % af nitrogenkilden. Efter 24 timers dyrkning ved pH 7,0 og 34 °C blev den fortløbende tilførsel af yderligere carbon- og nitrogenkilder indledt. Carbonkilden blev holdt som den begrænsende faktor, og det blev sikret, at der var oxygen til stede i overskydende mængder. Tilførsels-batchdyrkningen blev fortsat i 4 dage.

Isolering af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1

30 Den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, som koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, kan opnås fra den deponerede organisme *Escherichia coli* DSM 11299 ved hjælp af ekstraktion af plasmid-DNA ved hjælp af kendte metoder (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

Medier

YPD: 10 g gærestrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % glucose (sterilfiltreret) tilsat.

5 YPM: 10 g gærestrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % maltodextrin (sterilfiltreret) tilsat.

10 x basalsalt: 75 g gær-nitrogenbase, 113 g røvsyre, 68 g NaOH, H₂O til 1000 ml, sterilfiltreret.

10 SC-URA: 100 ml 10 x basalsalt, 28 ml 20 % casaminosyrer uden vitaminer, 10 ml 1 % tryptophan, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 3,6 ml 5 % threonin og 100 ml 20 % glucose eller 20 % galactose tilsat.

15 SC-agar: SC-URA, 20 g/l agar tilsat.

SC-variantagar: 20 g agar, 20 ml 10 x basalsalt, H₂O til 900 ml, autoklaveret.

PEG 4000 (polyethyleneglycol, molekylevægt = 4.000) (BDH, England).

20 EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

25 Fermentering af *Fusarium oxysporum*-phospholipase

En kultur af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 på et skråstivnet agarsubstrat blev overført til fem 500 ml-rystekolber, hver med 100 ml Bouillon-3-medium, og omrystet ved 30 °C i 1 dag (200 rpm, amplitude 2,5 cm).

30 Sammensætningen af Bouillon-3-medium var som følger:

	Pepton	6 g/l
	Trypsinfordøjet kasein	4 g/l
35	Gærestrakt	3 g/l
	Kødestrakt	1,5 g/l
	Glucose	1 g/l

Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

5 Dyrkningsmediet fra disse Boullion-3-rystekolber blev anvendt som podekultur til podning af tyve 500 ml-rystekolber, hver med 200 ml PL-1-medium.

Sammensætningen af PL-1-mediet var som følger:

	Pepton	10 g/l
10	Tween®-80	12 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g/l
	pH før autoklavering	6,0

15 Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

Hver PL-1-rystekolbe blev podet med 0,5-2 ml Boullion-3-dyrkningsmedium og rystet ved 200 rpm (amplitude 2,5 cm) ved 30 °C i 5 dage. Dyrkningsmediet fra rystekolberne blev puljet ved høst til opnåelse af 3,9 l med et enzymudbytte på 20 53 LU/ml.

EKSEMPEL 2

Oprensning af phospholipase

25 Trin 1) Én liter fermenteringssupernatant blev centrifugeret, og det resulterende præcipitat blev smidt ud. Supernatanten blev herefter justeret til 0,8 M ammoniumacetat ved hjælp af tilsætning af fast ammoniumacetat.

30 Trin 2) Hydrofobisk kromatografi - Toyopearl butyl 650 C-matrix blev leveret af Toso Hass (Röhm and Haas Company, Tyskland). En 50 ml-søjle blev pakket med matrixen. Søjlen blev vasket med 50 % ethanol og efterfølgende med vand. Søjlen blev herefter ækvilibreret med 0,8 M ammoniumacetat. Fermenteringssupernatanten, som var justeret med 0,8 M ammoniumacetat, blev herefter påsat søjlen. Ubundet materiale blev herefter vasket med 0,8 M ammoniumacetat, indtil alt UV-absorberende materiale (280 nm) var fjernet.

Søjlen blev herefter elueret med vand og efterfølgende med 50 % ethanol.

5 Phospholipase-aktivitet blev bestemt ved pH 4,5 og 40 °C ved anvendelse af Nefa-kittet som beskrevet ovenfor. Fraktioner, som indeholdt aktivitet i vand- og alkohol-eluat, blev puljet. Aktiviteten blev målt ved pH 4,5 ved anvendelse af et Nefa-kitassay.

10 Fraktioner, som indeholdt phospholipase-aktivitet, blev herefter puljet og dialyseret og opkoncentreret ved anvendelse af en Amicon-ultrafiltreringsmembran med en afskæring på 10 kDa.

(Trin 3) Negativ absorption på DEAE-hurtigflowkromatografi.

15 DEAE FF blev købt ved Pharmacia, og en 50 ml søjle blev pakket med matrixen.

Søjlen blev herefter vasket som beskrevet af producenten og ækvilibreret med 25 mM Tris-acetatbuffer, pH 7.

20 Den dialyserede og opkoncentrerede prøve blev herefter justeret til pH 7 og konduktans 2 mSi og påsat en DEAE FF-anionbytningssøjle. Aktivitet blev opsamlet som effluent. Aktiviteten binder ikke til en anionbytter ved pH 7.

25 Effluenten fra DEAE FF, som indeholdt aktivitet, blev opkoncentreret og dialyseret ved anvendelse af en Amicon-membran med en afskæring på 10 kDa og en 25 mM natriumacetat-buffer, pH 6.

Gelfiltrering på Superdex 75.

30 Superdex 75-forpakket søjle Hiload Tm 16/60 fra Pharmacia blev vasket og ækvilibreret med 25 mM natriumacetat, pH 6, som indeholdt 150 mM NaCl.

35 To ml af den opkoncentrerede effluent fra anionbytteren, som fremviste phospholipase-aktivitet ved pH 4,5 og 40 °C, blev påsat Superdex-søjlen.

Aktiviteten blev separeret fra ved hjælp af gelfiltrering med en flowhastighed

på 1 ml/minut.

EKSEMPEL 3

- 5 Karakterisering af oprenset phospholipase, som er opnået fra *Fusarium oxysporum*

10 En karakterisering som beskrevet nedenfor blev udført på en *Fusarium oxysporum*-phospholipase, der var fermenteret som beskrevet i eksempel 1 og oprenset som beskrevet i eksempel 2.

15 Molekylevægten for phospholipase-enzymet blev bestemt ved anvendelse af færdigstøbte 4 til 20 % SDS-PAGE-geler fra Novex Tm. Proteinets molekylevægt blev bestemt under reducerende betingelser som beskrevet tidligere.

For *F. oxysporum*-phospholipase viste molekylevægten sig at være 29-30 kDa under reducerende betingelser.

20 Det isoelektriske punkt blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia.

For *F. oxysporum* viste pl for proteinet sig at være omkring neutralt pH, fortrinsvis i intervallet 5,8 til 6,8.

- 25 Phospholipases termostabilitet

30 Termostabiliteten for phospholipase fra *Fusarium oxysporum* blev testet ved hjælp af DSC (differentiel scanningskalorimetri). Den termale denatureringstemperatur, Td, blev aflæst som spidsen af denatureringstoppen i termogrammer (Cp vs. T), der opnåedes efter opvarmning af enzymopløsninger ved en konstant, programmeret opvarmningshastighed.

Eksperimentelt

- 35 En DSC II fra Hart Scientific (Utah, US, 1993) blev anvendt til forsøgene.

50 mM bufrede oplosninger blev anvendes som oplosningsmiddel for enzymet

(ca. 2 mg/ml) ved enten pH 10 (50 mM glycinbuffer), pH 7 (50 mM HEPES-buffer + 10 mM EDTA) eller pH 4 (50 mM citratbuffer). Enzym blev oprenset ifølge eksempel 2 ovenfor.

5 750 µl enzymopløsning blev overført til 1 ml forsejelige standard-hastelloy-ampuller fra Hart Scientific. Ampuller blev indført i kalorimeteret og nedkølet til 10 5 °C i 15 minutter. Der blev foretaget termal ækvilibrering før DSC-scanningen. DSC-scanningen blev udført fra 5 °C til 95 °C ved en scanningshastighed på ca. 90 K/time. Denatureringstemperaturer blev bestemt ved en nøjagtighed på ca. ± 2 °C.

Resultater:

TABEL 1: Spids af denatureringstop som funktion af pH

pH	Td(°C)
4	57 °C
7	62 °C
10	55 °C

20 Det skal bemærkes, at disse forsøg blev udført i fravær af en oliematrix, som kan influere betydeligt på enzymstabilitet. DSC-resultaterne viser en maksimal stabilitet i nærheden af neutralt pH.

25 Hvis man forudsætter irreversibel termal denaturering, er en relevant arbejdstemperatur ved industriel anvendelse, såsom degummering af olie (US 5 264 367), mindst ca. 10 grader lavere end Td-temperaturerne, der er anført i tabel 1 ovenfor.

30 Aminoterminal sekvens

35 Aminoterminal analyse blev udført ved anvendelse af Edman-degradering med Applied Biosystem-udstyr (ABI 473A protein sequencer, Applied Biosystem, USA) som beskrevet af producenten.

N-terminal(e) sekvens(er):

For *Fusarium oxysporum*-phospholipasen er den N-terminale sekvens:

N-terminal A-V-G-V-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

- 5 Den N-terminale aminosyre "A" (Ala) er position 31 i SEQ ID NO: 2. Dette viser, at det modne phospholipase-enzym ifølge opfindelsen starter i position 31 i SEQ ID NO: 2.

Følgeligt er den modne sekvens fra 31-346 i SEQ ID NO: 2.

10

EKSEMPEL 4

Phospholipase A-aktivitet

- 15 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nef-a-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant phospholipase A-aktivitet ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

20

EKSEMPEL 5

Aktivitet mod L-a-lysophosphatidylcholin

- 25 Phospholipase-aktiviteten blev bestemt emd L-a-lysophosphatidylcholin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nef-a-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant aktivitet mod L-a-lysophosphatidylcholin ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

30

EKSEMPEL 6

Phospholipase-aktivitet i enkellags-opsætning

- 35 Et enkellags-udstyr (nul ordens-niveau, KSV5000, KSV Instruments, Finland) er blevet anvendt til måling af forskellige enzymers aktivitet mod phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin).

Forsøg

På den grundigt oprensede overflade af en bufferopløsning (10 mM TRIS, pH 8,0, 25 °C) blev et enkeltlag af DDPC spredt fra en chloroform-opløsning. Efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m, som svarer til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle. En bufferopløsning (se ovenfor), som indeholder ca. 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen af reaktionsdelen (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet". Enzymatisk aktivitet manifesterer sig ved hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter. Efter at have verificeret, at den vandige opløselighed af reaktionsprodukterne (kaprinsyre og DDPC) er betydelig højere end for DDPC, aestimeres antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut ved hjælp af enzymet, ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

Resultater

20

TABEL 2. Enzymers aktivitet mod DDPC i en enkeltlags-opstilling

	Enzym	Aktivitet ⁷ (nmol/min)
25	Sigma P9279 (PLA2 fra bigift, 850 U/mg)	1,9
	Enzym fra <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
	<i>Candida antarctica</i> -B bestanddels-lipase	0
	<i>Candida antarctica</i> -A bestanddels-lipase	0
30	Rekombinant marsvinepancreas-lipase (rGPL)	0,2
	Lipolase® (Novo Nordisk A/S)	< 0,1

⁷ Beregnet ud fra reduktion i enkeltlag-areal pr. tidsenhed, induceret ved hjælp af tilstedeværelse af enzym.

35

"Enzym fra *Fusarium oxysporum*" i tabel 2 er en phospholipase ifølge opfindelsen, der er oprensset som beskrevet i eksempel 2.

Konklusion

Der blev ingen phospholipase-aktivitet påvist for de fleste af enzymerne, bortset fra lipaser, der er opnået fra marsvinelipase, som viste mindre phospholipase-aktivitet.

Phospholipasen ifølge opfindelsen, der var opnået fra *Fusarium oxysporum*, viste overraskende høj signifikant phospholipase-aktivitet.

Følgeligt defineres i den foreliggende opfindelse udtrykket "phospholipase-aktivitet", der anvendes heri i forbindelse med en phospholipase ifølge opfindelsen, som en aktivitet, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist ovenfor, er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg. Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal, der specificerer phospholipase-aktivitet.

Et eksempel på en lipase med phospholipase-sideaktivitet ifølge definitionerne heri er marsvine-lipasen, der er vist i tabel 2 ovenfor. Nævnte marsvine-lipase har en phospholipase-sideaktivitet i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er mindre end 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg.

EKSEMPEL 7

Kloning og ekspression af en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672

Kloning og ekspression blev udført ved anvendelse af ekspressionskloning-i-gær-teknikken som beskrevet ovenfor.

mRNA blev isoleret fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, der var dyrket som beskrevet ovenfor, herunder bevægelse for at sikre tilstrækkelig ilttilførsel.

5 Mycelia blev høstet efter 3-5 dages vækst, straks nedfrosset i væskeformig nitrogen og opbevaret ved -80 °C. Et bibliotek fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, som bestod af ca. 9×10^5 individuelle kloner, blev konstrueret i *E. coli* som beskrevet med en vektorbaggrund på 1 %. Plasmid-DNA fra nogle af puljerne blev transformeret ind i gær, og der opnåedes 50-100 skåle, som indeholdt 250-400 gærkolonier, fra hver pulje.

10 Phospholipase-positive kolonier blev identificeret og isoleret i substratskåle (se ovenfor). cDNA-inserts blev amplificeret direkte fra gærkolonieme og karakteriseret som beskrevet i Materialer og metoder-afsnittet ovenfor. DNA- sekvensen for cDNA'et, der koder for phospholipasen, er vist i SEQ ID NO: 1, og den tilsvarende aminosyresekvens er vist i SEQ ID NO: 2. I SEQ ID NO: 1 definerer DNA-nukleotiderne fra nr. 23 til nr. 1060 det phospholipase-kodende område. Den del af DNA-sekvensen i SEQ ID NO: 1, som koder for den modne del af phospholipasen, omfatter positionerne 113 til 1060, der svarer til aminosyrepositionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2.

15 cDNA'et er opnåeligt fra plasmidet i DSM 11299.
20 Totalt DNA blev isoleret fra en gærkoloni, og plasmid-DNA blev indvundet ved hjælp af transformation af *E. coli* som beskrevet ovenfor. For at udtrykke phospholipasen i *Aspergillus* blev DNA'et fordøjet med passende restriktionsenzymer og størrelsesfaktioneret på gel, og et fragment, som svarede til phospholipasegenet, blev oprenset. Genet blev efterfølgende ligeret til pHD414 og fordøjet med passende restriktionsenzymer til opnåelse af plasmidet pA2PH10.

25 Efter amplifikation af DNA'et i *E. coli* blev plasmidet transformeret ind i *Aspergillus oryzae* som beskrevet ovenfor.

30 Test af *A. oryzae*-transformanter

35 Hver af transformanterne blev testet for enzymaktivitet som beskrevet ovenfor. Nogle af transformanterne havde en phospholipase-aktivitet, som var signifikant højere end *Aspergillus oryzae*-baggrunden. Dette viser effektiv ekspression af phospholipasen i *Aspergillus oryzae*.

EKSEMPEL 8Rekombinant ekspression af en *Fusarium oxysporum*-phospholipase

5 En *A. oryzae*-transformant, som omfattede *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pA2PH10 (se eksempel 7), blev tilførsels-batchfermenteret som beskrevet ovenfor. Oprensning af den rekombinant producerede *F. oxysporum*-phospholipase blev udført som beskrevet i eksempel 2.

10 EKSEMPEL 9Karakterisering af en rekombinant udtrykt og oprenset phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

15 Karakteriseringen blev udført på en rekombinant udtrykt og efterfølgende oprenset *Fusarium oxysporum*-phospholipase (se eksempel 8).

20 Disse karakteriseringsresultater med hensyn til den rekombinante *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen svarer perfekt overens med karakteriseringsresultaterne, der er vist i eksempel 3, hvor det blev vist, at det rekombinant udtrykte og oprensede enzym var det samme som den ikke-rekombinant udtrykte og oprensede phospholipase, der blev karakteriseret i eksempel 3.

25 Generelle assays, som anvendes til at karakterisere en rekombinant produceret phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*Phospholipase-assays

30 Phospholipase-aktivitet (PHLU) blev målt som frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin. 50 µl 4 % L-a- phosphatidylcholin (plante-lecithin fra Avanti, USA), 45 % Triton X-100, 5 mM CaCl₂ i 50 mM HEPES, pH 7, blev tilsat, 50 µl enzymopløsning, som var fortyndet til en passende koncentration i 50 mM HEPES, pH 7. Prøverne blev inkuberet i 10 minutter ved 30 °C, og reaktionen blev standset ved 95 °C i 5 minutter før centrifugering (5 minutter ved 7000 rpm). Fri fedtsyrer blev bestemt ved anvendelse af Nef C-kittet fra Wako Chemicals GmbH; 25 µl reaktionsblanding blev tilsat til 250 µl reagens A og inkuberet i 10

minutter ved 37 °C. Herefter blev 500 µl reagens B tilsat, og prøven blev inkuberet igen, 10 minutter ved 37 °C. Absorptionen ved 550 nm blev målt ved anvendelse af et HP 8452A dioderække-spektrofotometer. Prøver blev analyseret mindst in duplo. Substrat- og enzymblindprøver (forvarmede enzymprøver (10 minutter ved 95 °C) + substrat) blev indbefattet. Oleinsyre blev anvendt som fedtsyrestandard. 1 PHLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til af frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut under disse betingelser.

Alternativt blev assayet kørt ved 37 °C i 20 mM citratbuffer, pH 5 (Ca²⁺-afhængighed) eller 20 mM Britton-Robinson-buffer (pH-profil/temperaturprofil/stabilitet).

Phospholipase A1-aktivitet (PLA1) blev målt ved anvendelse af 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin (D3761 Molecular Probes) som substrat. 190 µl substrat (100 µl D3761 (2 mg/ml i ethanol) + 50 µl 1 % Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl₂, pH 7) i en 200 µl-kuvette blev tilsat 10 µl enzym, og absorptionen ved 410 nm blev målt som funktion af tiden på HP 8452A-dioderække-spektrofotometeret ved stuetemperatur. Aktivitet blev beregnet som kurvens hældning i det lineære område. PLA1 svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre (thiol)/minut ved disse betingelser.

Phospholipase A2-aktivitet (PLA2) blev målt ved 40 °C ved anvendelse af 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (H361 Molecular Probes). 2 ml substrat (50 µl 1 % Triton X-100 + 25 µl 0,1 % H361 i methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) i en 2 ml-kuvette med omrøring blev tilsat 10 µl enzym, og pyren-fluorescens-emissionen blev målt ved 376 nm (excitation ved 340 nm) som funktion af tiden (1 sekund-intervaller) ved anvendelse af Perkin Elmer LS50-apparatet. I Triton X-100/phospholipid-micellerne blev koncentrationen af phospholipid justeret til at have excimer-dannelse (emitterer ved 480 nm). Ved spaltning frigøres fedtsyren i 2-positionen, som indeholder pyrengruppen, til vandfasen, hvilket resulterer i en stigning i monomer-emissionen. PLA2 blev beregnet som hældningen af kurven i det lineære område ved tilsvarende betingelser.

35

Lipase-assays

Lipase-aktivitet (LU) blev målt ifølge Novo Nordisk publikation AF 95. Hydrolysen af tributyrin ved 30 °C og pH 7 blev efterfulgt af et pH-stat-titreringsforsøg. 1 LU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol smørsyre/minut under standardbetingelser.

5

Aktivitet på olivenolie (SLU) blev målt som følger: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9, blev tilsat til 2,5 ml Sigma Lipase-substrat. pH blev justeret til pH 9 eller lige under før tilsatning af 0,5 ml lipase-opløsning (fortyndet i buffer) og udførsel af et pH-stat-titreringsassay ved 30 °C ved anvendelse af Titrab, som er kommersielt tilgængeligt fra Radiometer A/S, København, Danmark. 1 SLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut ved pH 9, 30 °C.

10

Karakterisering af en rekombinant fremstillet *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

15

Assayene, som blev anvendt til karakterisering af enzymerne, der er nævnt nedenfor, var assayene, der er beskrevet umiddelbart ovenfor.

20

Enzymer

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

25

Enzymet blev rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Lecitase™ Batch L546-F06 (10368 IU/ml, ca. 20 mg/ml). Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

30

Ca²⁺'s indflydelse på phospholipase-aktiviteten hos *F. oxysporum*-lipase-phospholipase blev undersøgt. Der observeredes ingen større forskel, uanset om EDTA eller Ca²⁺ var indbefattet i assayet eller ej (se tabel 3 nedenfor), og enzymet synes således at være relativt uafhængigt af Ca²⁺.

35

TABEL 3. *F. oxysporum*-phospholipase-aktivitets (PHLU) afhængighed af EDTA og CaCl₂ - 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5 ved 37 °C

	5 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM CaCl ₂	2 mM CaCl ₂	5 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂
--	--------------	--------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------------

Relativ aktivitet ¹	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89
--------------------------------	------	------	---	------	------	------

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved 1 mM CaCl₂, der er normaliseret til 1.

pH-profilen blev undersøgt i Britton-Robinson-buffer ved anvendelse af plante-lecithin som substrat (tabel 4). Selvom enzymet viser en alkalisk pH-profil på phospholipid med et optimum ved pH 9 eller højere, er aktiviteten stadig tilstrækkelig høj til tilvejebringelse af degummering af olier ved lavt pH og anvendelse ved bagning (se nedenfor for en sammenligning af specifikke aktiviteter).

10

TABEL 4. *Fusarium oxysporum*-phospholipases pH-profil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR, 37 °C

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Relativ aktivitet ¹	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved pH 9, der er normaliseret til 1.

- 5 Temperaturprofiler for phospholipasen opnåedes ved pH 5; aktiviteten begynder at falde ved temperaturer over 40 °C (tabel 5). Dette er i rimelig overensstemmelse med temperaturstabiliteten, der måles ved præinkubering af enzymet og efterfølgende måling af residual-aktivitet (tabel 6), hvor enzymet er stabilt ved temperaturer op til 45 °C ved pH 5.

10

TABEL 5. *F. oxysporum*-phospholipase's temperaturprofil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR

	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

Alle data er vist som relative aktivitetsdata i forhold til aktiviteten ved pH 5, 40 °C, der er normaliseret til 1.

15

TABEL 6. *Fusarium oxysporum*-phospholipases temperaturstabilitet: præinkubation 30 minutter i 20 mM BR

	5 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Alle data er vist som residualaktivitetsdata, hvor aktiviteten efter præinkubation ved 5 °C er normaliseret til 1.

20

Enzymets lave stabilitet kan være fordelagtig til registrering af et eventuelt produkt som en proceshjælp, da det aktive enzym ikke bør forventes i slutproduktet ved hverken degummering af spiseolier eller i bagte produkter.

25

Phospholipasen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen, har både phospholipase- og lipase-aktivitet.

Følgeligt blev enzymets aktivitet på forskellige lipase- og phospholipase-substrater undersøgt og sammenlignet med aktiviteten hos den kommersielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ og den kommersielt tilgængelige lipase Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

5

F. oxysporum-phospholipase/lipasen har høj aktivitet på både tributyrin og olivenolie ved pH 7 og 9 (tabel 7). Til sammenligning er den specifikke aktivitet hos Lipolase® ca. 5000 LU/mg. Imidlertid fremviser *F. oxysporum*-lipasen i modsætning til Lipolase® en meget bredere specificitet med betydelig phospholipase-aktivitet og også thioesterase-aktivitet (se enkeltlags-eksempel 6 ovenfor, som viser, at Lipolase® ikke har en målbar phospholipase-aktivitet).

10

F. oxysporum-phospholipase/lipasen ifølge opfindelsen har en specifik aktivitet på lecithin, som er betydelig højere end den hos phospholipasen Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) ved pH 7 (tabel 7).

15

Sammenlignet med Lecitase™ har *F. oxysporum*-enzymet en 100 gange højere aktivitet ved pH 7. Phospholipase:lipase-forholdet for *F. oxysporum*-enzymet er ca. 0,225 (1000 LU/mg/225 PHLU/mg) under tilsvarende betingelser (pH 7 og 30 °C).

20

TABEL 7. *F. oxysporum*-lipase/phospholipasens aktivitet - sammenligning med Lecitase™

Enzym	LU/mg	PLU ¹ /mg	PHLU/mg	SLU/mg	PLA1/mg
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase™	<0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

25

¹PLU blev målt i lighed med PHLU men i 20 mM citrat, pH 5 og ved 37 °C i stedet for 50 mM HEPES, pH 7 ved 30 °C.

30

F. oxysporum-lipase/phospholipasens specificitet blev undersøgt ved anvendelse af substrater, der er specifikke for phospholipase A1, ved måling af spaltningen af thioester-bindingen i 1-positionen i 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin.

Enzymet hydrolyserer klart 1-positionen i phospholipid (tabel 7), mens Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) som forventet ikke viste aktivitet på dette

substrat.

C-terminal aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen ifølge opfindelsen

5

Den N-terminale aminosyresekvens for det rekombinant udtrykte modne phospholipase-protein blev bestemt som beskrevet i eksempel 3, og det blev fastslået, at denne N-terminale sekvens var den samme som bestemt for det ikke-rekombinant dannede og oprensede enzym (se eksempel 3).

10

MALDI-TOF-massespektrometri blev udført ved anvendelse af et VG TofSpec-massespektrometer (Micromass, Manchester, UK) som beskrevet i Christgau et al., Biochem. J. 319:705-712, 1996.

15

Baggrund

20 20

Den N-terminale aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen, som er udledt fra DNA-sekvensen, forudsætter i kombination med den kendte N-terminale aminosyresekvens for den modne phospholipase et protein på 315 aminosyrerester (aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2). Den teoretiske masse for dette udledte protein er 33.256,8 Da.

25

Ved anvendelse af MALDI-TOF-massespektrometri har vi tidligere bestemt massen af den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* til at være 28,2 kDa (data ikke vist), og på SDS-PAGE viste det sig, at molekylevægten er 29-30 kDa (se ovenfor).

30

Da de N-terminale sekvenser for den native og den rekombinante *F. oxysporum*-lipase er identiske, er det sandsynligt, at masseforskellen, som ses mellem den udledte masse og den eksperimentelle masse, er forårsaget af C-terminal processering.

35

For at undersøge dette har vi isoleret det C-terminale peptid fra den rekombinante *F. oxysporum*-lipase, som er udtrykt i *A. oryzae*, og sekventeret det gennem dets C-terminal.

Strategi

Den gennemsnitlige masse for den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* på 28,2 kDa kan anvendes til at forudsige den mest sandsynlige C-terminale rest, som viser sig at være Ser303 (SEQ ID NO: 2).

Denne forudsigelse er baseret på den formodning, at enzymet er ikke-glycosyleret. Det enkelte potentielle N-glycosyleringssite, som findes i sekvensen i Asn163, anvendes sandsynligvis ikke, da der findes en Pro-rest i position 164. Tilstedeværelsen af en Pro-rest i den anden rest i konsensussekvensen for N-glycosylering (Asn-Xaa-Ser/Thr) er aldrig blevet rapporteret. Endvidere tyder formen af toppen i massespektret ikke på glycosylering. Toppen er imidlertid bredere, end man sædvanligvis oplever for homogene proteiner, hvilket indikerer muligheden for størrelsesheterogenitet. Da enzymets N-terminal er veldefineret, er størrelsesheterogeniteten mest sandsynligt forårsaget af heterogen C-terminal processering.

En gennemgang af SEQ ID NO: 2 (se nedenfor) viser, at den udledte C-terminal er placeret tæt på den sidste af de 8 Cys-rester i sekvensen. Indførelse af en radioaktiv tag på Cys-resterne gør peptiderne, der indeholder Cys-rest, lette at spore gennem peptidoprensning. En kombination af den radioaktive tagging med proteolytisk degradering ved anvendelse af Asp-N-proteasen, som spalter foran Asp-rest, vil resultere i et tagget C-terminalt peptid. Endvidere vil tre indre peptider blive tagget. Sekventering af alle taggede peptider vil afsløre enzymets C-terminal.

31 AVGVTITDFS NFKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQGNGAT 80

81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSINIRNWLT NLDFGQEDCS 130

131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFNVIS TGHSILGGAVA 180

181 VLAANILRVG GTPVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS GGGGDKVDYT ISDVVKVCEGA ANLGCNGGTL 280

281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GFSWRRYRSA ESVDKRATMT DAELEKKLNS 330

331 YVQMDKEYVK NNQARS 346

SEQ ID NO: 2: Udledt aminosyresekvens for *F. oxysporum*-lipase/phospholipasen.

- 5 Sekvensen er udledt fra DNA-sekvensen og starter i N-terminalen, som er bestemt eksperimentelt for både det native og det rekombinante enzym. De 8 Cys-ester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, som er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑. Asn-resten, som findes i konsensussekvensen for N-glycosylering (NXS/T) er vist med (◊), men benyttes efter al sandsynlighed ikke, da X er en Pro-rest.
- 10

Forsøgsresultater

- 15 Enzymet var PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch-F-9700989, OD₂₈₀ = 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

Enzymet blev udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

Enzymet blev denatureret og disulfidbindingerne blev reduceret, før thiolgrupperne blev reageret med I-[1-¹⁴C]-CH₂CONH₂.

5

Efter den radioaktive tagging af Cys-vesterne blev lipasen degraderet ved anvendelse af Asp-N-proteasen.

10

De dannede peptider blev fraktioneret ved anvendelse af modfase-HPLC. De opsamlede fraktioner blev utsat for MALDI-TOF-massespektrometri og scintillationstælling. Fraktioner, som indeholdt betydelige mængder af radioaktivitet, blev valgt til fornyet oprenset ved anvendelse af modfase-HPLC.

15

De påny oprensede fraktioner blev utsat for scintillationstælling, og fraktionerne, som indeholdt radioaktivitet, blev efterfølgende sekventeret.

20

Nedenfor er vist en oversigt over resultaterne. Dette skema kan se kaotisk ud på grund af de mange anførte sekvenser. Skemaet indeholder imidlertid al den sekvensdata, der er opnået fra de radioaktive fraktioner, og udgør derfor grundlaget for de dragede konklusioner. Det skal bemærkes, at alle Cys-vester er dækket ved sekventeringen, de fleste af dem mere end en gang. En anden ting at bemærke er, at de afvigende spaltninger, som ses, resulterer i et stort antal små radioaktivt mærkede peptider.

U U U

NG CPT
NNG CPTVQ
CSN
CSNNG CP
CSNNG CPTV

CNSEAAA GSKI

31 AVGVIITDPS NFKPYIQQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQGNGAT 80

↓
DCS
DCS

81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSINIRNWLT NLDFGQEDCS 130

U

LVSGC
LVSGCGVHSG FQRAW
131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFNVIS TGHSLGGAV 180

181 VLAANLRVG GTPVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

U U
DVKVCEG
DVKVCEGA ANLGCNGGTL
DVKVCEGA ANLGCNGGTL

231 PRILPPLIFGY RHTTPEFWLS GGGGDKVDTT ISDVKVCEGA ANLGCNGGTL 280

U

DACNAG GPS
GL TDACNAG GF
281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GPSWRRYRSA ESVDKRATMT DAELEKKLNS 330

↑

331 YVQMDKEYVK NNQARS

346

5 Aminosyresekvenserne, der er opnået ved hjælp af sekventering af de radioaktivt taggede peptider, stammende fra rekombinant *F. oxysporum*-enzym. Sekvenserne er parallelstillet med aminosyresekvensen, der er udledt fra DNA-sekvensen. De 8 Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, der er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.

Forsøgskonklusion

- 10 Ud fra sekventeringen af alle de radioaktivt taggede peptider er det klart, at den C-terminale del af aminosyresekvensen, der kodes i DNA'et, processeres under ekspressionen af lipasen fra *F. oxysporum*. Peptidsekvenserne peger på Ser303 som den mest sandsynlige C-terminale rest i det modne enzym i overensstemmelse med resultatet fra MALDI-TOF-massespektrometri.
- 15 På basis af dataene kan det imidlertid ikke udelukkes, at der finder differentiel C-terminal processering sted, som fører til heterogene C-termini, for eksempel tyder ét peptid på, at Phe272 også kan findes som en C-terminal rest.

20 EKSEMPEL 10

Generel beskrivelse af assay for enzymatisk degummering af spiseolie

Udstyr til udførelse af enzymatisk degummering

- 25 Udstyret består af en 1 l-kappebeklædt stålreaktor, som er udstyret med et stållåg, en skrue (600 rpm), skærme, en temperaturføler, et indløbsrør i toppen, en tilbageløbskøler (4 °C) i toppen og et udløbsrør i bunden. Reaktorkappen er forbundet med et termostatbad. Udløbsrøret er ved hjælp af silikoneslanger forbundet til et Silverson-i linie-blandehoved, der er udstyret med en "firkantet hul- høj shearing-skærm", som styres af en Silverson L4RT-høj shearing-lab-blander (8500 rpm, flow ca. 1,1 l/minut). Blandehovedet er udstyret med en køleslange (5-10 °C) og et udløbsrør, der via silikoneslanger er forbundet med reaktorens indløbsrør. En temperaturføler er indsat i silikoneslangen umiddelbart efter blandehovedet. Den eneste forbindelse fra reaktor/blandehoved-systemet til atmosfæren er gennem tilbageløbskøleren.

Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering

Alt køle- og termostatusstyr tændes. Herefter indføres 0,6 l (ca. 560 g) olie i reaktoren, som holdes på ca. den temperatur, der er nødvendig for det specifikke forsøg. Lab-blanderen tændes, hvorved olien starter med at cirkulere fra reaktoren til blandehovedet og tilbage til reaktoren. Systemet får mulighed for at ækvilibrere i ca. 10 minutter, i løbet af hvilket tidsrum temperaturen finindstilles. Forbehandlingsperioden starter med tilsætning af 0,6 g (2,86 mmol) citronsyremonohydrat i 27 g MilliQ-vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % (vægt/vægt; [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM), hvilket sætter $t = 0$. Til $t = 30$ minutter tilsættes en passende mængde af en 4 M NaOH-opløsning.

15	0,0 ækviv. 4 M NaOH	-> pH 3,7
	1,0 ækviv. 4 M NaOH (0,71 ml)	-> pH 4,5
	1,5 ækviv. 4 M NaOH (1,07 ml)	-> pH 5,0
	2,0 ækviv. 4 M NaOH (1,43 ml)	-> pH 5,5
	2,5 ækviv. 4 M NaOH (1,79 ml)	-> pH 6,2
	3,0 ækviv. 4 M NaOH (2,14 ml)	-> pH 8,0

20 Til $t = 35$ minutter udtages prøver til P-analyse og pH-bestemmelse. Umiddelbart herefter tilsættes den nødvendige mængde af enzym-opløsning (slut på forbehandlingsperiode). Prøver til P-analyse og pH-bestemmelse udtages til $t = 1, 2, 3, 5, 6$ timer, og herefter standses reaktionen.

25 Reaktor/blande-systemet tømmes og vaskes med 2 x 500 ml 10 % Deconex/DI-vandopløsning efterfulgt af minimum 3 x 500 ml DI-vand. Tabel 8 viser en oversigt over de forskellige tilsætninger og prøvetagninger under reaktionen.

30

TABEL 8. Plan for enzymatisk degummering

Tid	Tilsætning af	Prøvetagning	
		P-analyse	pH-bestemmelse
		X	
0	Citronsyre		
5 min.			X
30 min.		X	X
30 + δ min.	NaOH		
35 min.		X	X
35 + δ min.	Enzym		
1 time		X	X
2 timer		X	X
3,5 timer		X	X
5 timer		X	X
6 timer		X	X

Phosphor-analyse

5 Prøvetagning til P-analyse:

Anbring 10 ml vand-i-olie-emulsion i et glascentrifugerør. Opvarm emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter. Centrifugér ved 5000 rpm i 10 minutter. Overfør ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et 12 ml-polystyrenrør og lad det 10 stå (til bundfældning) i 12-24 timer. Efter bundfældning udtag ca. 1-2 g fra den øverste klare fase til P-analyse.

P-analyse blev udført i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)":

15 Afvej 100 mg MgO (leicht, Merck nr. 5862) i en porcelænskål og opvarm med

- en gasbrænder. Tilsæt 1-2 g olie og antænd med en gasbrænder til opnåelse af en sort, hård masse. Opvarm i en Vecstar-ovn ved 850 °C i 2 timer til opnåelse af hvid aske. Opløs asken i 5 ml 6 M HNO₃ og tilsæt 20 ml reagensblanding. Hensæt i 20 minutter. Mål absorbans ved 460 nm (anvend en blank (5 ml HNO₃ + 20 ml reagensblanding) til nuljustering). Beregn ved anvendelse af kalibreringskurve.

pH-bestemmelse

- 10 Udtag 2 ml vand-i-olie-emulsion og bland med 2 ml MilliQ-vand. Efter faseseparering afpipetter det øverste olielag. Mål pH i vandfase med pH-elektrode Orion. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af formlen:

$$15 \quad \text{pH}_{\text{real}} = \text{pH}_{\text{målt}} - 0,38.$$

- En kalibreringskurve opnåedes ved hjælp af oplosning af 0,6 g citronsyremonohydrat i 27 g DI-vand, pH i denne oplosning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{real}). 100 µl blev blandet med 2 ml MilliQ-vand, og pH i denne oplosning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{målt}). pH i citronsyre-oplosningen blev ændret gradvist ved hjælp af tilsætning af NaOH-oplosning, og for hver justering blev fortynding og pH-målinger udført som beskrevet ovenfor.

25 EKSEMPEL 11

Optimale degummeringsbetingelser for Lecitase™

- Alle forsøg vedrørende degumming af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

- 30 Olie:
Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.
Batch C00730/B01200, 9 kg, P-indhold 186 ppm (0,47 % phosphatid).
35 Olien er ikke et kommersielt tilgængeligt produkt, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

Enzym:

Lecitase™ 10L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

- 5 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med Lecitase™ er vist i tabel 9. Standardbetingelser er: enzymdosis 535 U/kg olie (1,1 mg/kg olie), 60 °C, 2,0 ækviv. NaOH (pH 5,5). Enzymdosen er varieret fra 268-1070 U/kg olie, temperaturen er varieret fra 40-70 °C, og NaOH-tilsætning er varieret fra 1,0-3,0 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 9.
- 10

TABEL 9. Specifikke betingelser for Lecitase™-optimering

For- søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH- niveau	Enzymdosis (U/kg olie)
10	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	0 (blind)
21	Colzro 1208	60 °C	0,0	3,7	0 (blind)
8	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
9	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
11	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	268
12	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	1070
15	Colzro 1200	70 °C	2,0	5,5	535
17	Colzro 1200	50 °C	2,0	5,5	535
18	Colzro 1200	40 °C	2,0	5,5	535
19	Colzro 1200	60 °C	1,0	4,5	535
40	Colzro 1209	60 °C	1,5	5,0	535
44	Colzro 1429	60 °C	2,5	7,0	535
20	Colzro 1200	60 °C	3,0	8,0	535

- 15 pH fra t = 35 minutter - 6 timer. Indenfor dette tidsrum var alle pH-bestemmelser inden for et smalt interval. Dette illustreres yderligere i eksempel 13 nedenfor.

En oversigt over de separate optimeringsundersøgelser er vist i tabel 10.

Resultaterne i tabel 10 viser:

- 5 i) at det af dosis/reaktions-undersøgelsen fremgår, at optimal enzymdosis
(ved 60 °C og 2,0 ækviv. NaOH) er ca. 535 U/kg olie. Halv dosis øger
degummeringstiden fra ca. 3,5 timer til 6 timer, og dobbelt dosis frembringer
ingen ændring i degummeringsydeevnen. Enzymblindprøve-resultaterne er
indsat til sammenligning,
- 10 ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) med dårlig
ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5) og 3,0 ækviv. (pH ca. 8),
- 15 iii) at optimal temperatur er ca. 60 °C, da 70 °C ikke bringer P-niveauet helt
ned, 50 °C øger degummeringstiden fra ca. 3,5 til 6 timer, og 40 °C giver dårlig
ydeevne.

TABEL 10: Resultater vedrørende optimering af Lecitase™-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
10	160	140	116	118	108	109	105	109
21	178	149	-	143	142	143	147	154
8	164	139	117	85	30	-	2	3
9	164	136	109	79	14	4	3	4
11	183	149	123	104	78	35	10	7
12	165	131	117	71	13	3	4	3
15	170	139	127	83	23	10	11	9
17	162	134	127	95	56	15	11	5
18	176	151	136	100	66	28	24	28
19	171	139	147	142	142	118	91	80
40	184	149	157	126	109	73	40	30
44	226	202	197	148	99	66	40	34
20	165	136	111	102	90	81	73	72

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase ved angivne tidspunkter i timer.

5 EKSEMPEL 12

Optimale degummeringsbetingelser for en *Fusarium oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

- 10 Alle forsøg med enzymatisk degummering af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00730/B01208, P-indhold ca. 200 ppm

Batch C00730/B01209, P-indhold ca. 200 ppm

5 Batch C00730/B01429, P-indhold 227 ppm

Batch C00730/B01430, P-indhold 252 ppm

Olierne er ikke kommersielt tilgængelige, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

10 Enzym:

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700123, $OD_{280} = 1,48$, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.

15 Enzymet var udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med PL fra *Fusarium oxysporum* er vist i tabel 11. Standardbetingelser er: enzymdosis 1,6 mg/kg olie, 40 °C, 1,5 ækviv. NaOH (pH ca. 5,0). Enzymdosis er varieret fra 0,2-1,6 mg/kg olie, temperaturen er varieret fra 30-50 °C, og NaOH-tilsætningen er varieret fra 1,0-2,5 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 11.

TABEL 11. Specifikke betingelser til optimering af PL fra *Fusarium oxysporum*

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (mg/kg olie)
31	Colzro 1208	40 °C	1,5	5,0	1,6
53	Colzro 1429	40 °C	1,5	5,3	1,6
33	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,8
35	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,4
36	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,2
38	Colzro 1209	50 °C	1,5	5,0	1,6
64	Colzro 1430	45 °C	1,5	5,0	1,6
39	Colzro 1209	30 °C	1,5	5,0	1,6
32	Colzro 1209	40 °C	1,0	3,5	1,6
13	Colzro 1200	40 °C	1,0	4,5	1,6
45	Colzro 1429	40 °C	1,25	5,0	1,6
46	Colzro 1429	40 °C	1,75	5,5	1,6
34	Colzro 1209	40 °C	2,0	5,5	1,6
37	Colzro 1209	40 °C	2,5	6,2	1,6

5 Forsøgsresultaterne er vist i tabel 12 nedenfor. pH-afgivelserne i tidsvinduet 35 minutter - 6 timer faldt alle inden for de forventede intervaller med kun mindre uregelmæssigheder.

Sammenfattet viser resultaterne i tabel 12 nedenfor:

- 10 i) at det af dosis/reaktions-testene fremgår, at den optimale enzymdosis (ved 40 °C og 1,5 ækviv. NaOH) er ca. 0,8 mg/kg olie,
- ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 1,5 ækviv. (pH ca. 5,0) med ingen ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5), med begrænset ydeevne ved 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) og 2,5 ækviv. (pH ca. 6,2), og

iii) at den optimale temperatur er ca. 45 °C, og 50 °C giver begrænset ydeevne.

5

TABEL 12: Resultater vedrørende optimering af *Fusarium oxysporum*-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
31	169	130	136	15	8	7	8	7
53	232	203	208	32	10	7	7	4
33	188	156	160	27	7	6	6	8
35	181	153	153	78	5	5	4	6
36	187	162	157	117	61	32	20	15
38	187	149	146	84	83	68	58	55
64	252	192	201	10	4	4	4	4
39	184	163	158	36	7	7	9	9
32	167	137	165	152	146	151	148	146
13	170	140	141	140	133	126	130	131
45	221	189	195	161	118	99	92	95
46	225	187	163	93	4	7	6	15
34	189	174	165	61	27	25	26	19
37	205	168	157	88	22	23	20	21

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase på angivne tidspunkter i timer.

EKSEMPEL 13Visning af standard-pH-afvigelser under en enzymatisk degummeringsproces

5 Tabel 13 nedenfor viser et gennemsnitseksempel for pH-afvigelser under den enzymatiske degummeringsproces, der udføres som beskrevet i eksempel 10.

Forsøgene udføres med Lecitase™. Se eksempel 11 for yderligere detaljer.

10 TABEL 13: pH-værdier fra $t = 35$ minutter - 6 timer

Tid (timer)	pH Forsøg 8 (2,0 ækv)	pH Forsøg 15 (2,0 ækv)	pH Forsøg 19 (1,0 ækv)	pH Forsøg 20 (3,0 ækv)
0,58	4,97	5,80	4,45	7,38
1,0	5,82	5,75	4,46	7,63
2,0	5,50	5,44	4,57	8,13
3,5	5,35	5,34	-	8,37
5,0	5,25	5,47	4,47	8,21
6,0	5,01	5,26	4,43	8,05

Hvis ikke andet er angivet i eksemplerne på forsøg med enzymatisk degummering, der er beskrevet heri, var standard-pH-afvigelserne i nævnte forsøg som vist i tabel 13 ovenfor.

15

EKSEMPEL 14Sammenligning af enzymatisk degummeringskapacitet hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen

20

I figur 2 er vist resultaterne fra PL'erne under deres respektive optimale betingelser, som bestemt i eksempel 11 og 12 ovenfor.

Forsøgsbetingelser, der er vist i figur 2:

25

Lecitase™: 60 °C, pH 5,5 (2,0 ækviv. NaOH) og 1 mg enzym/kg olie (ca. 535 U) (forsøg nr. 9).

5 *Fusarium oxysporum* PL: 40 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 0,8 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 33).

Fusarium oxysporum PL: 45 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 1,6 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 64).

10 Tilsyneladende giver PL fra *Fusarium oxysporum* en meget hurtig degummeringseffekt sammenlignet med Lecitase™.

PL fra *Fusarium* ifølge opfindelsen giver en næsten total degummering efter ca. 25 minutters kontakt mellem enzym og olie.

15

EKSEMPEL 15

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i forskellige typer af spiseolier

20

Olier:

Rårapsfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.

Denne batch indeholder faste rester.

25

Rårapsfrøolie fra Scanola (Danmark).

Batch C00745/B01593, P-indhold 315 ppm.

Filtreret rårapsfrøolie.

30

Batch C00745/B01146 filtreret, P-indhold 231 ppm.

Denne olie er Batch C00745/B01146 ovenfor (609 ppm), der er filtreret gennem et 100 µm Johnson-filter.

35

Rårapsfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Rapsfrøolie fra Lurgi, Tyskland.

Batch C00932/B1381, P-indhold 148 ppm.

Råsojabønneolie fra Arhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00744/B01145, P-indhold 593 ppm.

5

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor, blev udført ved hjælp af forbehandling af olieerne ved hjælp af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

I korte træk omfatter forbehandlingsprocessen,

15

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

20

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

25

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

30

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer,

35

efter bundfældning udtag 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien. ppm-værdien blev bestemt som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Ifølge denne proces var mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som var til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor:

35

rårapsfrøolien nr. 1146 fra AOM, der indeholder fast partikelholdigt materiale, som til dels er ansvarligt for det høje P-niveau (609 ppm), filtrering gennem et 100 µm Johnson-filter gav en klar olie med et P-indhold på 231 ppm.

- Forbehandling af råolien og af den filtreredeolie gav et P-niveau på 140 ppm, som er et mål for de ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i olien;
- 5 phospholipid-indholdet i en rårapsfrøolie fra Scanola blev reduceret fra 315 ppm til ca. 30 ppm ved hjælp af forbehandling,
- 10 phospholipid-indholdet i en rapsfrøolie, som var opnået fra Lurgi (sandsynligvis vilkårlig blanding af råolie og totalt raffineretolie), blev reduceret til 60 ppm ved hjælp af forbehandlingsprocessen,
- 15 forbehandling rårapsfrøolie nr. 1710 fra AOM reducerede P-indholdet fra 459 til 200-250 ppm,
- 20 ved råsojabønneolie nr. 1145 fra AOM reducerede forbehandling P-niveauet fra 593 til 10 ppm. Denne sojabønneolie er et eksempel på enolie, der kan degummeres ved hjælp af vanddegummering/citrat-behandling alene. Enzymtilsætning til denne råsojabønneolie efter forbehandling reducerede ikke P-indholdet yderligere.
- 25 Disse data viser, at phospholipid-sammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) i rårapsfrøolie varierer meget fra én batch til en anden, og følgeligt vil niveauet af resterende phospholipid i vanddegummeret rapsfrøolie variere over et bredt interval (30 ppm (Scanola) til 200-250 ppm (AOM)).
- 30 Til enzymatisk degummering afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbart phospholipid, som er til stede efter degummering eller forbehandling.
- 35 Endvidere gælder det, at jo højere mængde af ikke-hydrerbart phospholipid, der er til stede i olien, jo mere anvendelig er den enzymatiske degummeringsmetode.
- Dette illustreres også i eksempel 16 nedenfor, hvor den foreliggende opfindelse viser enzymatisk degummering af rårapsfrøolie nr. 1146, som har et ikke-hydrerbart phospholipid-niveau på ca. 140 ppm.

EKSEMPEL 16Degummering af rårapsfrø-spiseolie (I)

- 5 Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

- Rårapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
10 Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.
Denne batch indeholder faste rester.

Enzym:

- Lecitase™ 10 L.
15 Batch L646-F02 (10190 U/ml), aestimeret koncentration 20 mg/ml.

- PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.
Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, aestimeret koncentration 0,9
20 mg/ml.
Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A (reference)

- 25 0,6 l (580 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes 30 µl (300 U) Lecitase™ 10L (som er leveret af Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i tabel 14.
- 30

TABEL 14. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med Lecitase™

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,8
0,58	146	5,6
1,0	127	5,6
2,0	88	5,7
3,5	61	5,7
5,0	44	5,6
6,0	34	5,8

Forsøg B

- 5 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,4. Til $t = 35$ minutter tilsættes 1 ml (0,9 mg) af en oprenset oplosning (eksempel 2) af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i
10 tabel 15.

TABEL 15. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,9
0,58	149	5,4
1,0	91	5,3
2,0	13	5,4
3,5	11	5,3
5,0	13	5,4
6,0	10	5,2

EKSEMPEL 17

5

Degummering af rårapsfrø-spiseolie (II)

Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

Olie:

Rårapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01710, P-indhold 459 ppm.

15

Enzym:

Lecitase™ 10 L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), aestimeret koncentration 20 mg/ml.

20

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700470, OD₂₈₀ = 0,8, renhed ca. 58 %, aestimeret koncentration 0,45 mg/ml.

Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A

5 0,6 l (580 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (for eksempel 50 μ l (ca. 500 U) til 1 mg enzym/kg olie) af Lecitase 10L (som er opnået fra Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 16.

10

TABEL 16. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med Lecitase

Tid (timer)	1 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	2 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	3 mg Lecitase /kg olie P(ppm)
0	459	459	459
0,50	251	235	248
0,58	202	194	202
1,0	181	186	183
2,0	165	156	107
3,5	111	66	11
5,0	52	12	12
6,0	20	5	9

Forsøg B

15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,0. Til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1,6 mg enzym/kg olie og 3,2 mg enzym/kg olie) af en oprenset opløsning af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 17.

20

TABEL 17. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	1,6 mg <i>Fusarium</i> / kg olie, P(ppm)	3,2 mg <i>Fusarium</i> / kg olie, P(ppm)
0	459	459
0,50	236	208
0,58	193	173
1,0	109	96
2,0	9	7
3,5	9	8
5,0	9	9
6,0	9	9

Sammenfattet viser resultaterne:

5

Lecitase, 60 °C, pH 5,5

Enzymdosen blev varieret fra 1,0 til 3,0 mg/kg olie. Resultaterne er vist i tabel 16 ovenfor. Ved en enzymdosis på 1,0 mg/kg olie var degummering langsom og gav ca. 20 ppm efter 6 timer. Med de høje enzymdoser blev degummerings-ydeevnen forbedret til opnåelse af et phosphorindhold på 10 ppm efter ca. 3,5 timer med 3,0 mg enzym/kg olie.

10

Det formodes, at ydeevnen vil forbedres yderligere, hvis der anvendes højere enzymdoser.

15

F. oxysporum PL, 45 °C, pH 5,0

Enzymdoserne 1,6 og 3,2 mg/kg olie blev testet, og ydeevnen viste sig at være lige god (tabel 17 ovenfor). Med 1,6 mg enzym/kg olie - eller muligvis mindre - observeredes fortræffelig degummering, som gav 9 ppm P efter ca. 2 timer. Det forventes, at det er muligt at anvende endnu lavere mængder af *F. oxysporum*-phospholipase (for eksempel 0,9 mg/kg olie) og stadig opnå god degummerings-ydeevne.

EKSEMPEL 18Degummering af vanddegummeret spiseolie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, der er opnået fra *Fusarium culmorum*

5

Der blev udført et forsøg ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

10 Vanddegummeret rapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00730/B01700, P-indhold 231 ppm.

Enzym:

15 Et fermenteringsmedium fra *Fusarium culmorum*.
En *Fusarium culmorum*-stamme blev dyrket og centrifugeret, og supernatanten blev oprenset som beskrevet nedenfor.

20 Podekulturer af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 (deponeringsdato den 25. oktober 1994) blev frembragt i 500 ml-rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende sammensætning:

Majsudblødningsvæske (tørret)	12 g/l
Glucose	24 g/l

25 Til hver kolbe tilskættes 0,5 g CaCO₃ og 0,5 mlolie. pH justeres til 5,5 før autoklavering.

Efter 3 dage ved 26 °C og 250 rpm blev 5 ml af hver af podekulturerne podet i rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende medium:

30

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Pepticase, Sheffield Products	4 g/l
Gærekstrakt, Difco 0127	3 g/l
Kødestrakt, Difco 0126	1,5 g/l
Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olivenolie, Sigma	10 g/l

pH justeres til 7,3-7,4 før autoklaving.

5 Dyrkning fandt sted i 9 dage ved 26 °C og 250 rpm. Medierne blev centrifugeret og filtreret (0,45 µm) og supernatanterne opsamlet og anvendt til degummeringsforsøgene, der er vist nedenfor.

Æstimeret aktivitet 200 PHLU/ml.

10 Forsøg: Enzymatisk degummering af en vanddegummeret olie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, som er opnået fra *Fusarium culmorum*

15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,5. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1070 PHLU/kg olie) af en oprenset oplosning af phospholipase fra *F. culmorum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 18.

20 TABEL 18. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med phospholipase fra *F. culmorum*

Tid (timer)	1070 U <i>F. culmorum</i> /kg olie P(ppm)
0	254
0,50	-
0,58	213
1,0	137
2,0	61
3,5	9
5,0	8
6,0	7

EKSEMPEL 19Enzymatisk degummering af råolie ved anvendelse af Degomma VOD

5 Olie:
Rårapsfrøolie C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

10 Enzym:
En kommercial tilgængelig phospholipase Degomma VOD (Röhm, Tyskland),
æstimeret koncentration 10 mg/ml.

15 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 50 °C. Til $t = 30$ minutter tilsættes 0,714 ml (2,86 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 4,5. til $t = 35$ minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 3,6 mg/kg olie eller 7,1 mg/kg olie) af en oprenset oplosning af Degomma VOD-phospholipase. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 19.

TABEL 19

Tid	3,6 mg/kg olie	7,1 mg/kg olie
0	276	273
0,50	216	253
0,58	210	246
1,0	127	94
2,0	45	16
3,5	15	7
5,0	15	10
6,0	14	10

20 Dette eksempel viser, at Degomma VOD er i stand til at degummere en spiseolie. For at opnå en tilfredsstillende degummering af nævnte olie kræves imidlertid relativt høje doser af Degomma VOD sammenlignet med *Fusarium*-phospholipasen ifølge opfindelsen. Se for eksempel eksemplerne 16 og 17 til

sammenligning.

EKSEMPEL 20

- 5 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et brødforbedrende middel

Materialer og metoder

- 10 Fremstilling af brød

Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

15	<u>Grundopskrift</u>	
	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
	Gær	4 %
	Salt	1,5 %
20	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

25	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
30	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
	Hævning (32 °C, 82 % RH)	
	Kuvertbrød:	45 min.
35	Formbrød:	55 min.
	Bagning (230 °C)	
	Kuvertbrød:	22 min.

Formbrød: 35 min.

Vurdering af dej og bagte produkter

5 Egenskaberne for dejen og de bagte produkter blev bestemt som følger:

10 Specifikt volumen-ideks: Volumen af et brød eller et kuvertbrød måles ved hjælp af den traditionelle rapsfrø-fortrængningsmetode. Det specifikke volumen beregnes som volumen ml pr. g brød. Det specifikke volumen af kontrollen (uden enzym) defineres som 100. Det relative specifikke volumen-indeks beregnes som:

$$\text{Specifikt volumen-indeks} = \frac{\text{brødets specifikke volumen}}{\text{specifik volumen af kontrolbrød}} \times 100$$

15 Dejens klæbetilbøjelighed vurderes manuelt i overensstemmelse med følgende skala:

20	Kuvertbrødform:	meget flad	1
		flad	2
		normal	3
		god/rund	4
		meget god	5
		for rund	6

25

30

35

RESULTATER

TABEL 20

Enzym/ additiv								
A)					1	1	1	1
B)		500	1500	3000		500	1500	3000
C)	100	110	106	93	99	111	116	108
D)	100	106	99	94	102	107	109	103
E)	3	4	4	3	3	4	5	4,5

- 5 A) Lecimulthin 100 (g/kg mel)
 B) F.o.-phospholipase (LU/kg mel)
 C) Specifikt volumen-indeks (kuvertbrød)
 D) Specifikt volumen-indeks (formbrød)
 E) Kuvertbrødform (score)

10 Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Resultaterne viser en klar volumenforøgende effekt af *Fusarium oxysporum*-phospholipase på både kuvertbrød og formbrød ved opskriften, som ikke indeholder lecithin. Hvis lecithin indbefattes i opskriften, opnås endnu bedre volumeneffekter, selvom lecithin ikke selv bidrager til volumen. En statistisk analyse (ANOVA, $\alpha = 0,05$), som blev udført i Statgraphics Plus, release 3.0, viser en signifikant positiv synergি mellem phospholipasen og lecithinén.

15 20 Både med og uden lecithin i opskriften opnås en betydeligt forbedret form af kuvertbrød med *F. oxysporum*-phospholipasen. I dette eksempel opnåedes den bedste kuvertbrødform ved en blanding af lecithin og phospholipase (1500 LU/kg mel).

EKSEMPEL 21

25 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et anti-friskhedstabende middel

Materiale og metoderFremstilling af brød

5 Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

Grundopskrift

	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
10	Gær	5 %
	Salt	1,5 %
	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
20	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
25	Hævning (32 °C, 82 % RH)	55 min.
	Bagnning (230 °C)	35 min.

30 I dette eksempel blev brødene anbragt i forme med låg for at undgå forskelle i de specifikke volumener før strukturanalyse. Efter nedkøling blev brødene opbevaret ved stuetemperatur, pakket i plastikposer.

Vurdering af bagte produkter

Vurdering af friskhedstab og struktur kan udføres ifølge AACC-metoden 74-09.

En vurdering af brødkrummers blødhed som indikator for brøds friskhedstab blev udført 0, 1, 3 og 7 dage efter bagning i overenstemmelse med følgende 5
procedure:

10 En skive brød blev komprimeret ved konstant hastighed i en strukturanalyse (TA TX-2), og styrken af kompressionen blev målt i g. Krummens fasthed måles som styrken ved 25 % kompression. En brødkrummes fasthed stiger efterhånden som brødet mister friskhed.

Resultater

15 Resultaterne fra fasthedsmålinger som funktion af opbevaringsdage er vist i tabel 21. Lecimulthin blev tilsat i en koncentration på 1 g/kg mel, og *Fusarium oxysporum*-phospholipasen blev tilsat i en dosis på 500 U/kg mel. Hvert resultat i tabellen er gennemsnitsværdien for 6 målinger (2 brød, 3 målinger på hver).

20 TABEL 21

Enzym/additiv	Fasthed Dag 0	Fasthed Dag 1	Fasthed Dag 3	Fasthed Dag 7
Kontrol	223	350	631	1061
Lecimulthin 100*	225	261	532	1010
Phospholipase	201	303	573	1257
Lecimulthin 100* + phospholipase	169	304	468	834

*Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

25 Som det fremgår af tabel 21, var brødene, der var behandlet med phospholipase, lidt blødere end kontrollen op til 3 dages opbevaring. I kombination med lecithin kunne der opnås en betydelig anti-friskhedstabende effekt under hele opbevaringen (som ikke er opnåeligt med lecithin eller phospholipase alene).

SEKVENSLISTE

5 SEQ ID NO: 1 viser en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som omfatter en DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 1

- 10 (i) SEKVENSEGENSKABER:
 (A) LÆNGDE: 1170 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHED: enkeltstrenget
 (D) TOPOLOGI: lineær
- 15 (ii) MOLEKYLETYPE: cDNA
- (vi) NATURLIG OPRINDELSE:
 (A) ORGANISME: *Fusarium oxysporum*
 (B) STAMME: DSM 2672
- 20 (ix) EGENSKAB:
 (A) NAVN/KODE: CDS
 (B) PLACERING: 23..1063
- 25 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1

TTGGAGAATA TTCCCTTGTC	CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG	GCC ATC	52
	Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile		
	1 5 10		
ACC CTC GCG GTA GCC AGT CCT GTA GCT CTC GAC GAC TAC CTC AAC TCT			100
	Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser		
	15 20 25		
CTT CAG CAG CGA GCT GTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC AGC AAC TTC			148
	Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe		
	30 35 40		
AAG TTC TAC ATC CAA CAC CGC GCC GCA GCT TAC TGC AAC TCT GAA CCC			195
	Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala		

30

35

45

50

55

GCA GCT GGT TCC AAG ATC ACC TGC TCC AAC AAT GGC TGT CCA ACC GTT 244
 Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val
 60 65 70

CAG GGC AAC GGA GCG ACC ATC GTG ACA TCT TTC GTT GGC TCC AAG ACA 292
 Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr
 75 80 85 90

GGT ATC GGT GGC TAC GTC GCG ACA GAC TCT GCC CGA AAC GAA ATC GTC 340
 Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val
 95 100 105

GTC TCG TTC CGC GGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TGG CTT ACC AAC CTC 388
 Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu
 110 115 120

GAC TTC GGC CAG CAA GAC TCC ACT CTC GTC TCT GGA TGC GGT GTG CAC 436
 Asp Phe Gly Gln Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His
 125 130 135

TCT CGC TTC CAG CGA GCC TGG AAT GAG ATC TCG TCT CAA GCA ACC GCT 484
 Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala
 140 145 150

GCT GTT GCC TCC GCC CGC AAG GCG AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT 532
 Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser
 155 160 165 170

ACA GGC CAC TCC CTT CGA GCT CCC GTG GCC GTT CTT GCT CCC GCA AAC 580
 Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Asn
 175 180 185

TTC AGA GTC GGT GGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GGC TCT CCC 628
 Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro
 190 195 200

CGT GTC GGA AAC GCG CAG CTC TCA GCC TTC GTC TCA AAC CAG GCT GGT 676
 Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly
 205 210 215

CGA GAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT 724
 Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro
 220 225 230

CCT CTC ATC TTC GGA TAC AGG CAC ACA ACT CCT GAC TTC TGG CTG TCC	772
Pro Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser	
235 240 245 250	
GGC GGT GGA GGC GAC AAG GTT GAC TAC ACC ATC AGC GAT GTC AAG GTC	820
Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val	
255 260 265	
TGT GAG GGT CCT GCC AAC CTT CGA TCC AAC GGT GGA ACT CTT GGT TTG	868
Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu	
270 275 280	
GAT ATT GCT GCT CAT CTG CAT TAC TTC CAG GCG ACT GAC GCC TGT AAC	916
Asp Ile Ala Ala His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn	
285 290 295	
CCT GGT GGC TTC TCT TCG CGA CGA TAC AGA AGC GCC GAG AGC GTC GAC	964
Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp	
300 305 310	
AAG AGG CCC ACC ATG ACT GAT GCC GAG CTT GAG AAG AAG CTG AAC TCT	1012
Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser	
315 320 325 330	
TAT GTC CAG ATG GAT AAG GAG TAT GTG AAG AAT AAC CAG GCC CGC TCT	1060
Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser	
335 340 345	
TAA CGACGGTATG AGGTTTGATG GGAAATGACA TGATTCATGA ACGAAACCAT	1113

AGTACATATG ATGCCAAATAG GATATAAAAAA CAAATTTCAT TCACTAGCTT TACACAA 1170

5 SEQ ID NO: 2 viser aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 2

- | | | |
|----|------|----------------------------------|
| 10 | (i) | SEKVENSEGENSKABER: |
| | (A) | LÆNGDE: 346 aminosyrer |
| | (B) | TYPE: aminosyre |
| | (D) | TOPOLOGI: lineær |
| 15 | (ii) | MOLEKYLETYPE: protein |
| | (xi) | SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2 |

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
1 5 10 15

Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
20 25 30

Gly Val Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
50 55 60

Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
65 70 75 80

Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
100 105 110

Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
115 120 125

Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
130 135 140

Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
145 150 155 160

Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly

165	170	175
Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr		
180	185	190
Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln		
195	200	205
Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr		
210	215	220
His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr		
225	230	235
Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Asp Lys		
245	250	255
Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn		
260	265	270
Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu		
275	280	285
His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp		
290	295	300
Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr		
305	310	315
Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys		
325	330	335
Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser		
340	345	

Patentkrav:

1. Polypeptid, som fremviser phospholipase A-aktivitet, der er valgt fra gruppen, som består af:

5

(a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

10

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c)

et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

15

(d) et polypeptid, der er mindst 70 % homologt med polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c).

2. Polypeptid ifølge krav 1, som er en phospholipase A1.

20

3. Polynukleotid, som omfatter en sekvens, der er valgt fra gruppen, som består af:

(c)

25

(a) den phospholipase A-kodende sekvens, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

(b) nukleotiderne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,

(c) nukleotiderne 113-1063 i SEQ ID NO: 1,

30

(d) nukleotiderne 113-931 i SEQ ID NO: 1,

(e) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

35

(f) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

(g) et polynukleotid, der er mindst 70 % homologt med et hvilket som helst

af ovennævnte polynukleotider, hvor polynukleotidet koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase A-aktivitet.

4. Polynukleotid ifølge krav 3, der koder for et phospholipase A1-polypeptid.

5

5. Vektor, som omfatter polynukleotidet ifølge krav 3 eller 4.

6. Værtscelle, som omfatter vektoren ifølge krav 5.

10 7. Værtscelle ifølge krav 6, som er en eukaryotcelle, især en svampecelle, såsom en trådsvampecelle, for eksempel *Aspergillus* eller *Fusarium*.

(C)

8. Fremgangsmåde til frembringelse af en phospholipase A, som omfatter:

15 (a) dyrkning af værtscellen ifølge krav 6 eller 7 under betingelser, der er passende til ekspression af phospholipasen og

(b) indvinding af phospholipasen.

20 9. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces, som omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtacylgrupper.

(C)

25 10. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, der har et phosphorindhold fra 50-250 ppm, som omfatter behandling af olien med polypeptidet til hydrolysering af en stor del af phospholipidet og separering af en vandfase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid, fra olien.

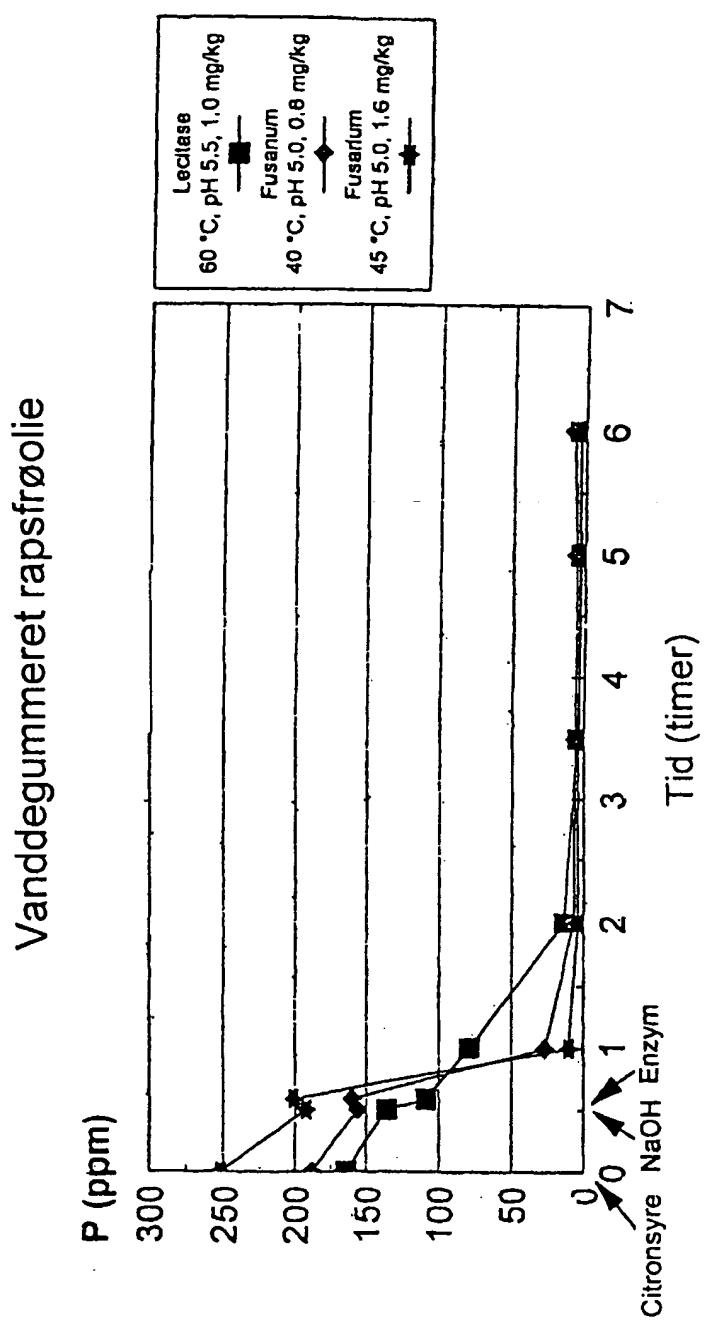
30 11. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til frembringelse af et bagt produkt, som omfatter tilsætning af polypeptidet til en dej og bagning af dejen til frembringelse af det bagte produkt.

35

F.oxysporum	1	-M-L-[PULLSAITLAVASPVA-[DODYVNSLEERA F.heterosporum	1	MML-VLSSL-[AFTAAGPVPSVDENTRALEHRA	31
F.oxysporum	32	[VGVT[TD]FSN[FKY][QHGAAYCNSSEAAGSKI F.heterosporum	34	VTVT[TD]LSN[ERFY][QHADAAYCNFNTAVGKPV	66
F.oxysporum	65	TCSNN[GCP[VQGN[GAT[VT[SVGS[KT[GIGGYVA F.heterosporum	67	HCSAGNC[PDI[EKAII[VYGS[VVGTKT[GIGAYVA	97
F.oxysporum	98	TDS[ARKEIVVS[FRGS[NI[RNWL[TD[FGQEDCS F.heterosporum	100	TDN[ARKEIVVS[VRSI[VRNW[TN[NGQKTCDO	130
F.oxysporum	131	[LVSGCGVHS[GFORAWNEISSQATAAVASAR[KAN F.heterosporum	133	[LVAGCGVHT[GFLDAM[EEVAANVKAAVSAAK[TAN	165
F.oxysporum	164	PSFNV[STGHSLGGAVAVLA[AAN[RVGGTPV[D F.heterosporum	166	PTEKFVVVTGHSLGGAVATIAAYLRLKQDGFQD	188
F.oxysporum	197	YTYS[GSPRVGNAQSLAFVSNQAGGEYRVTHADDP F.heterosporum	199	YTYS[GSPRVGNDFFAN[FVTOQATGAEYRVTHGDDP	228
F.oxysporum	230	VPRALPPL[FGYRHT[PEFWLS[G[GOKVOYTIS F.heterosporum	232	VPRALPPI[VFGYRHTS[PEYWLN[G[GOKLOK-DYT]VT	231
F.oxysporum	263	DVKVCEGAAN[GCNGGT[GLD[AAHLHYFQATD F.heterosporum	284	EIKVCEGI[ANVMCNGGT[GLD[LAHITYFQSMA	255
F.oxysporum	286	ACNAGGF[SWF[RYRSAESVDKRAT[MTDAELEKKL F.heterosporum	297	TCAPIAIPWKE[...-...-...-DMSDDEELEKKL	286
F.oxysporum	329	NSYVQMD[KEYVKNNQARS F.heterosporum	319	TQYS[EMDQEFVQKMI[...-...-...-DMSDDEELEKKL	348

一
正

2/2

Fig. 2 Oliedegummering - *Fusarium* PL vs. Lecitase

Novozymes A/S
Att.: Mira Hansen
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

31. SEP 2002

MSH

Reference	Country
MSH	01. OKT. 2002
Action	Term

Den 27. september 2002

Vi kvitterer hermed for modtagelse af sagsnr. p4798202dk, der skal oversættes fra engelsk til dansk.

Vi bekræfter samtidig, at fristdatoen er den 6. december 2002.

Med venlig hilsen
Lingtech A/S



Kristina Breyen

LINGTECH

<input type="checkbox"/> ENGELSK	<input type="checkbox"/> TYSK	<input type="checkbox"/> FRANSK OVERSETTELSE				
<input checked="" type="checkbox"/> T. DANSK						
Fra firma		Novozymes A/S				
Dato		24/9-2002				
Side- antal	Ialt	Beskr.	Krav	Sm.drag	Tegn.	Andet
Fremsejnt af		Mira S. Hansen				
Sagsnummer		4798.202-EP/DC				
Sagsbehandler		Sten L. Knudsen				
Sagsområde		Lipase				
Ønskes retur (dato)		6/12-2002				
Evt. forslag til hvem der skal oversætte						
Evt. bem. vedr. terminologi						
UDFYLDES AF LINGTECH						
Oversætter						
Sendt dato		Frist dato				
Retur dato		Antal ord				
Afr.bil.nr.		Fakt.nr.				
Bem.						

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.